F 1330
L. 040401
1981: VOL: 24

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 24

1981

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 24, nr. 1, p. 1—124, 1981, Bucureşti

SCBIAS—24 (1), (1981)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 de lei.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136—137, telex 11226, 79517—București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P.O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 24, nr. 1 1981

IANUARIE — IUNIE

SUMAR

LASCĂR M. BURUIANĂ, Contribuţii româneşti în biochimie 3

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Glicogenoliza şi glicoliza în intoxicaţia experimentală cu cadmiu 15

DANIELA BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, Studiul acţiunii unor ioni metalici asupra activităţilor catalitice ale α-chimotripsinei libere şi imobilizate pe Sepharose 4 B, activată cu BrCN 21

N. ŞT. CHIŞIU, DOINA ONICĂ, O. MAIOR, SILVIA MIHĂESCU, Reacţia imunoglobulinei G cu substanţe din clasa flavonoidelor 35

SIMONA COFARU, CORNELIA RUSU, Studiul electroforetic în funcţie de vîrstă al proteinelor mitocondriale din ficatul de şobolan 51

V. DARIE, M. ŞERBAN, Ureogeneza în diabetul aloxanic 57

VALENTINA JURCA, ELVIRA TANASE, Acţiunea unor derivaţi ai acizilor orto- şi metaaminobenzoici asupra activităţii fosfatazei acide la plante . . 61

MAGDALENA LUNGU, ANCA ROŞEANU, MONA VOCIU, ELENA SĂSĂRMAN, S.S. VASU, MARIA CERCEL, Dinamica unor activităţi enzimatice la producătorul de lizină *Corynebacterium melassecola* în faza de inocul şi fermentaţie 71

ERSILIA MUNTEANU, DOINA OŞIANU, C. BODEA, Cercetări asupra pigmenţilor carotenoidici din *Solanum laciniatum* Ait. şi culturile de ţesuturi ale acestei plante 81

P. PETCU, ECATERINA ANDRONESCU, D. BEDELEANU, VICTORIA BORZA, Cercetări fito-biochimice asupra plantei *Xanthium spinosum* L. . 85

SONIA SANIELEVICI, LUCIA BUZILĂ, ELENA GANEA, ARINA MINEI, CECILIA MOTAŞ, Variaţia imunoglobulinei A secretoare (SIgA) în materiile fecale la sugari în funcţie de alimentaţie 91

H.D. SCHELL, A. WAHEED, DANIELA BĂNĂŢEANU, MARIA RABEGA, T. BENŢIA, Obţinerea şi caracterizarea α-chimotripsinei imobilizate pe derivaţi ai agarozei 97

M. ZAMFIR, VL. GHEORDUNESCU, Înlocuirea sulfatului de litiu din import necesar în reactivul Folin-Ciocâlteu cu săruri de litiu indigene 109

VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ 115

RECENZII 117

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 24, N° 1 1981

JANUARY — JUNE

CONTENTS

LASCĂR M. BURUIANĂ, Romanian contributions to biochemistry 3
ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Glycogenolysis and glycolysis in cadmium experimental intoxication 15
DANIELA BĂNĂŢEANU, H.D. SCHELL, A. WAHEED, Untersuchung der Einwirkung einiger Metallionen auf die katalytischen Eigenschaften des freien und des an BrCN-aktivierte Sepharose 4 B gebundenen α-chymotrypsins 21
N. ŞT. CHIŞIU, DOINA ONICĂ, O. MAIOR, SILVIA MIHĂESCU, Interaction of human IgG with flavonoids 35
SIMONA COFARU, CORNELIA RUSU, Electrophoretic study of liver mitochondrial protein from young, adult and aged rats 51
V. DARIE, M. ŞERBAN, L'uréogenèse en diabète alloxanique 57
VALENTINA JURCA, ELVIRA TANASE, Action of *o*- *m*-aminobenzoic acids on plant acid phosphatase 61
MAGDALENA LUNGU, ANCA ROŞEANU, MONA VOCIU, ELENA SĂSĂRMAN, S.S. VASU, MARIA CERCEL, The activity of some enzymes in the lysine producing *Corynebacterium melassecola* in the inoculum and during fermentation 71
ERSILIA MUNTEANU, DOINA OŞIANU, C. BODEA, Studies on carotenoid pigments in *Solanum laciniatum* Ait. and the tissue cultures of this plant . . 81
P. PETCU, ECATERINA ANDRONESCU, D. BEDELEANU, VICTORIA BORZA, Phyto-biochemical investigations on *Xanthium spinosum* L. . . . 85
SONIA SANIELEVICI, LUCIA BUZILĂ, ELENA GANEA, ARINA MINEI, CECILIA MOTAŞ, Variation of secretory immunoglobulin A (SIgA) in the faeces of breast- and formula-fed newborn infants dependent on nutrition 91
H.D. SCHELL, A. WAHEED, DANIELA BĂNĂŢEANU, MARIA RABEGA, T. BENŢIA, Horstellung und Eigenschaften des an agarosederivate immobilisierten α-chymotrypsins 97
M. ZAMFIR, VL. GHEORDUNESCU, The substitution of imported lithium sulphate with indigenous lithium salts in the preparation of the Folin-Ciocâlteu reagent 109
SCIENTIFIC LIFE 115
REVIEWS 117

CONTRIBUŢII ROMÂNEŞTI ÎN BIOCHIMIE

LASCĂR M. BURUIANĂ

În a doua jumătate a secolului al XIX-lea şi la începutul celui de-al XX-lea a apărut o nouă ramură a chimiei, denumită de F. Hoppe-Seyler (1870) *chimie fiziologică* şi de G. Bertrand (1900) *chimie biologică*. Savanţi ca J. Liebig, Cl. Bernard, L. Pasteur, pentru a aminti numai de clasici, au pus definitiv bazele acestei specialităţi. Ulterior, alţi savanţi iluştri au lămurit nu numai compoziţia materiei vii, ci şi procesul ei chimic, denumit de Th. Schwann încă din 1839 metabolism (de la grecescul μεταβολικός = care provoacă transformări).

La edificiul grandios al biochimiei actuale şi-au adus aportul şi o seamă de oameni de ştiinţă români, care în condiţii precare de lucru au realizat contribuţii originale pentru dezvoltarea în continuare a acestei noi ramuri ştiinţifice. Din păcate, lucrările acestor pionieri sînt puţin cunoscute, multe dintre ele fiind publicate în reviste de circulaţie restrînsă, care nu ajung în torentul mondial al biochimiei. De remarcat că aceşti savanţi nu au beneficiat de existenţa unor institute specializate şi de colaboratori care să continue şi să îmbogăţească observaţiile şi ipotezele valoroase elaborate în acest domeniu. Este o datorie a noastră să facem cunoscute cîteva din cele mai importante realizări ale înaintaşilor care au avut contribuţii prioritare pe plan mondial, deschizînd drumuri noi de aplicabilitate practică, unele citate în literatura de biochimie fără ca cei care le utilizează să bănuiască măcar că autorii sînt români, altele complet ignorate, aşa cum am semnalat anterior (1).

În acest sens menţionăm metoda de dozaj al proteinelor din diverse lichide biologice sau extrase tisulare. Această problemă, dificilă şi incomplet rezolvată pînă în prezent, a cunoscut o importantă simplificare şi perfecţionare prin utilizarea reacţiei biuretului. Publicată pentru prima oară în 1914 de **Emanoil Riegler**, profesor de chimie la Facultatea de medicină din Iaşi, metoda are la bază principiul potrivit căruia substanţele proteice în mediul alcalin dau cu oxidul de cupru o culoare violetă, a cărei intensitate este proporţională cu cantitatea de proteină (2). Această metodă a fost propusă de E. Riegler cu 35 de ani înaintea celei imaginate de A. G. Gornall, C. J. Bardawill şi M. M. David (3). Metoda, cunoscută astăzi sub denumirea de metoda biuretului a lui Gornall şi colaboratori, este utilizată pentru dozarea proteinelor în diferite medii în limitele 1—10 mg.

Un alt român, **Vintilă Ciocâlteu**, lucrînd în Laboratorul de chimie al Şcolii de medicină din Harvard, condus de O. Folin, a propus un reactiv nou, cunoscut de atunci sub denumirea de reactivul Folin — Ciocâlteu, pentru dozarea tirozinei şi a triptofanului din hidrolizatele proteice.

Modul de preparare a reactivului a fost publicat în anul 1927 (4). Acest reactiv, de notorietate mondială, este larg utilizat în numeroase tehnici din domeniul biochimiei. El a fost folosit de O. H. Lowry şi colab. (5) în 1951 la sensibilizarea reacţiei biuretului, aplicată la dozarea proteinelor din diferite medii şi utilizată ca micrometodă aproape ubicuitar.

După cum se vede, cercetările originale a doi români au furnizat principiul şi metoda de rafinare a celei mai răspîndite tehnici din domeniul biochimiei moderne.

Un alt român ale cărui lucrări au constituit punctul de plecare a numeroase cercetări de biochimie din cele mai diferite domenii — reproducţie, spermiologie, enzimologie, biologie moleculară şi celulară, medicină etc. — este **Radu Vlădescu**, profesor de chimie biologică la Facultatea de medicină veterinară din Bucureşti. Contribuţiile sale se referă la repartiţia şi la rolul zincului în organismul animal. Lucrînd între anii 1919 şi 1921 în Laboratorul de chimie al Institutului Pasteur din Paris, sub conducerea lui G. Bertrand, a determinat cu mare precizie conţinutul în zinc din organele şi lichidele biologice la animale. Rezultatele au fost publicate într-o serie de memorii (6), (7), (8), (9), în lucrări de referinţă universal apreciate azi şi care au constituit punctul de plecare a numeroase cercetări de biologie cu largă aplicaţie în medicină şi agricultură. Una dintre lucrările care au declanşat o avalanşă de cercetări în domeniul reproducţiei la om şi la animale, intitulată „Intervention probable du zinc dans les phénomènes de fécondation chez les animaux vertébrés" (8), se încheie cu concluzia, verificată şi unanim acceptată, că, potrivit observaţiilor publicate, zincul are un rol important în organismul animalelor vertebrate, intervenind în funcţia de reproducere şi, dacă se ţine seamă de mobilitatea lui, în procesele de reglare şi de secreţie internă. Sincronizarea dintre ciclul spermatogenezei şi absorbţia zincului a fost bine stabilită, lipsa acestui element ducînd la oprirea spermatogenezei (10). Această constatare stă la baza a numeroase cercetări moderne din domeniul spermiologiei şi al reproducţiei (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17). Th. Mann, autorul celui mai complet tratat de biochimie a spermei (18), îl citează pe R. Vlădescu ca fiind primul cercetător care a semnalat existenţa acestui microelement în glandele sexuale şi rolul său în fenomenele de fecundaţie.

Alte observaţii care au stabilit rolul zincului în domeniul biologiei moleculare şi celulare sînt legate de variaţia lui cantitativă în cursul dezvoltării. Ele au fost publicate în lucrarea „Sur la variation de la teneur en zinc de l'organisme de lapin durant la croissance" (7), în care se menţionează că proporţia de zinc din organismul iepurelui prezintă un maxim în momentul naşterii; ea diminuează puţin cîte puţin în perioada de lactaţie, după care creşte rapid. Într-o altă lucrare, „Sur les causes de variation de la teneur en zinc des animaux vertébrés; influence de l'âge" (9), se precizează, ca o concluzie generală, dar nu absolută, că zincul din organismul animal atinge maximul la tinereţe. Aceste concluzii au declanşat cercetări care au demonstrat că zincul are o funcţie esenţială în procesul de sinteză al ADN şi implicit în cursul dezvoltării. Celulele în faza de repaus G_1 trebuie stimulate pentru intrarea în faza S printr-un semnal constînd din preluarea unei cantităţi de zinc indispensabile în sinteza ADN-polimerazei. Deficienţa în zinc este mai accentuată în celulele cu proliferare rapidă, iar activitatea ribonucleazei este inhibată de concentraţia normală

a zincului, crescînd în testicule și în alte țesuturi animale carențate în zinc. Deficiența în zinc provoacă de asemenea parakeratoza la porci și deformarea picioarelor la pui prin alterarea funcțiilor la nivel celular. Și în terapia arsurilor, zincul joacă un rol esențial, așa cum reiese dintr-o serie de cercetări recente care citează pe G. Bertrand și R. Vlădescu ca primii ce au atras atenția asupra prezenței zincului în țesuturi și asupra mobilității lui (19).

Un alt om de știință român care merită a fi considerat precursor într-unul din cele mai importante și actuale capitole ale biochimiei este profesorul **Haralambie Vasiliu** de la Facultatea de agronomie din Iași. Încă din anul 1936, H. Vasiliu a publicat, sub titlul „Asupra configurației moleculare a materiilor albuminoase grase și a hidraților de carbon" (20), ipoteza despre aranjamentul în spirală al lanțurilor polipeptidice din compoziția proteinelor, precum și al altor biopolimeri, cum sînt glucidele și lipidele. Această ipoteză, justificată printr-o serie de calcule deduse din proprietățile moleculare și fizice ale substanțelor respective, este cu 15 ani anterioară celei propuse de L. Pauling, R. B. Corey și H. R. Branson (21). Asemănarea dintre structura în spirală pentru materiile albuminoase și α-helixul lui Pauling este uimitoare, așa cum se poate vedea comparînd aranjamentul helicoidal al lanțurilor polipeptidice după H. Vasiliu (fig. 1,*A*) și α-helixul lui Pauling și colab. (fig. 1,*B*). Un aspect simplificat și stilizat al spiralei lui H. Vasiliu, foarte asemănător cu cel întîlnit în mai toate tratatele de biochimie moderne la capitolul despre structura proteinelor, este cel redat în figura 2. Autorul, ținînd seama de importanța acestor compuși, subliniază că „un aport cît de mic în sensul clarificării structurii moleculare își are însemnătatea lui" ((20), p. 5).

Pentru a justifica acest aranjament, H. Vasiliu face unele presupuneri, pe care le vom rezuma în cele ce urmează.

1. „Atomii de carbon și de azot între care se stabilește legătura peptidică se găsesc pe o spirală tangentă la un hexagon deschis. Forțele ce mențin acest aranjament deschis se datoresc modificărilor direcției de valență dintre atomii de carbon sau azot, așezați în vîrfurile hexagonului și care exercită o presiune din afară spre interior. Această compresiune stabilizează aranjamentul ciclic al lanțului de aminoacizi". Se vede din această presupunere că H. Vasiliu era tributar teoriei tensiunii în cicluri, care domina încă în acea perioadă chimia organică. Vasiliu face însă un pas înainte, admițînd existența unor cicluri „deschise".

2. Ținînd seama de densitatea albuminei, găsește, cu ajutorul unor calcule pur geometrice care nu țin seama decît de distanțele interatomice, nu și de unghiurile direcțiilor de valență, că distanța dintre spire ar fi de 2 Å. Valoarea nu corespunde exact cu cea admisă în prezent, deși, după cum se va vedea, ipoteza făcută cu privire la forțele de legătură dintre spire pledează pentru o altă valoare, foarte aproape de cea admisă azi.

3. Forțele care consolidează spirele unele în raport cu altele sînt de natură apolară, adică forțe de coeziune Van der Waals (azi London-Van der Waals), numite și forțe de dispersie, deoarece se datoresc asimetriei provocate de modificarea distribuției electronice, așa încît fiecare atom poate fi considerat ca un dipol. Or, acestea sînt maxime la distanța

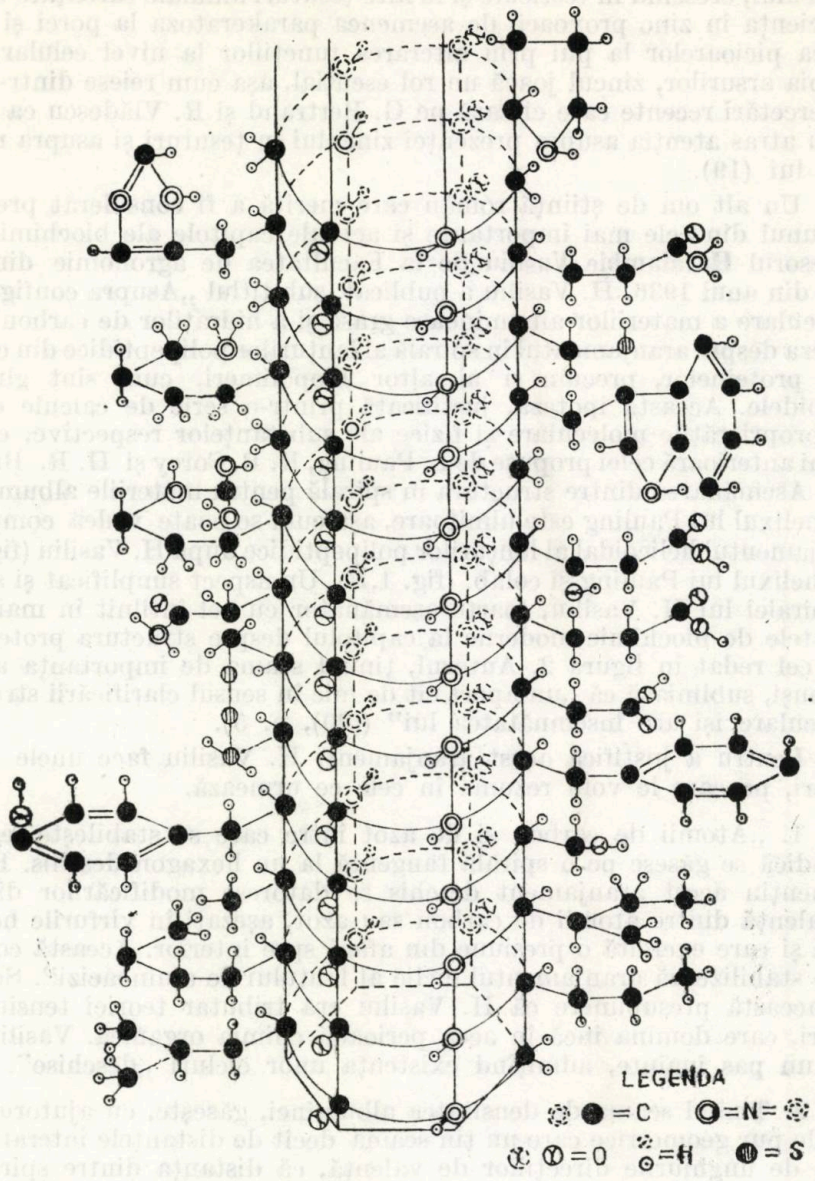


Fig. 1. — A, Configurația moleculei materiilor albuminoase, după H. Vasiliu (20).

de 5 Å. Se știe că, în cazul cînd helixul conține 3,7 resturi de aminoacizi, perioada de identitate (pasul elicei) este de 5,4 Å, iar în cazul cînd helixul conține 5,1 resturi, este de 5,03 Å. Afirmația, făcută de Vasiliu, că stabilizarea spiralei s-ar datora forțelor Van der Waals poate fi considerată ca justă și prin aceasta se corectează și calculul de la punctul 2.

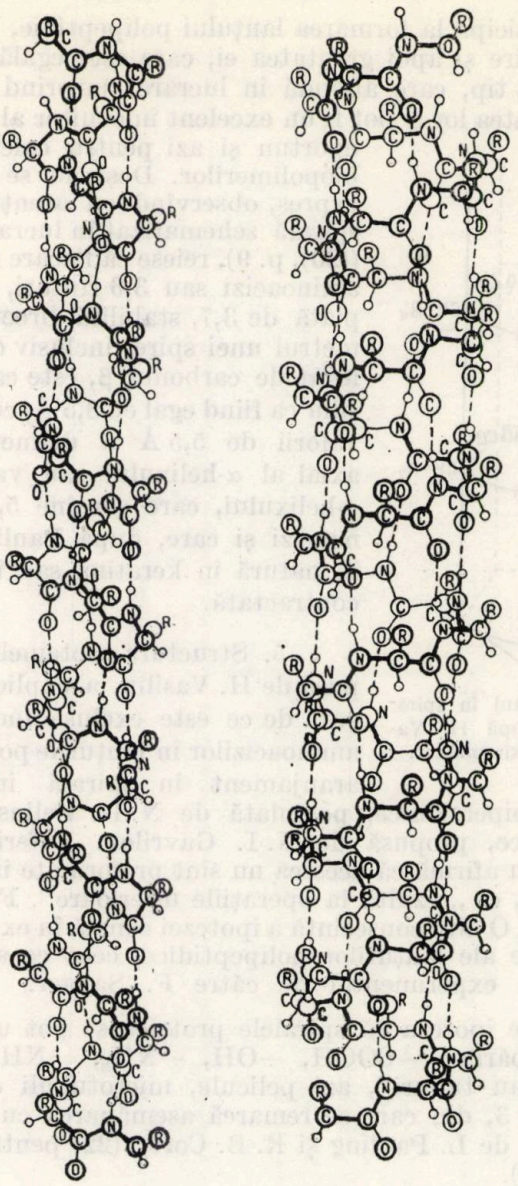


Fig. 1. — *B*, α-Helixul lui L. Pauling și colab. (21):
a, helixul cu 3,7 resturi de aminoacizi pe spiră; *b*, helixul cu 5,1 resturi de aminoacizi pe spiră.

L. Pauling și colab. atribuie această stabilizare a spiralelor legăturilor de hidrogen formate între hidrogenul amidic și oxigenul carbonilului, care în fond sînt tot legături Van der Waals.

4. Avînd în vedere distanțele interatomice și apreciind mărimea medie a radicalilor laterali, legați de carbonii β din constituția amino-

acizilor care participă la formarea lanţului polipeptidic, Vasiliu calculează volumul unei spire şi apoi greutatea ei, care este egală cu 14×10^{-23} g. Calcule de acest tip, care abundă în lucrare, surprind prin exactitatea şi prin originalitatea lor şi pot fi un excelent înlocuitor al roentgenografiei, oportun şi azi pentru calculul parametrilor biopolimerilor. Deşi nu se specifică în mod expres, observînd cu atenţie fragmentul de spirală schematizat în lucrarea lui H. Vasiliu ((20), p. 9), reiese că fiecare spiră conţine 18/5 aminoacizi sau 3,6 resturi, cifră foarte apropiată de 3,7, stabilită direct de Pauling. Diametrul unei spire, inclusiv catena radicalului legat de carbonul β, este calculat de H. Vasiliu ca fiind egal cu 8,5 Å, ceea ce corespunde valorii de 5,5 Å a diametrului cilindrului axial al α-helixului sau valorii de 6,6 Å a γ-helixului, care conţine 5,1 resturi de aminoacizi şi care, după Pauling, se întîlneşte în natură în keratină sau în miozina supracontractată.

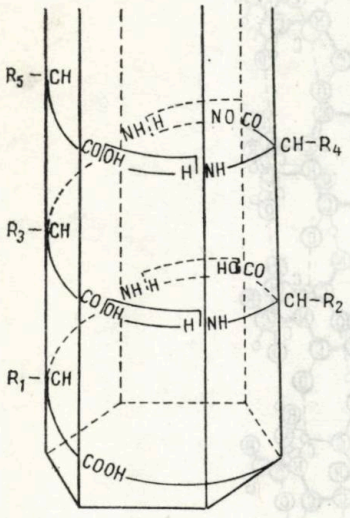


Fig. 2. — Aranjamentul în spirală al proteinelor, după H. Vasiliu (20), model simplificat.

5. Structura proteinelor în spirală, propusă de H. Vasiliu, a explicat pentru prima oară de ce este exclusă încorporarea β- şi γ-aminoacizilor în lanţurile polipeptidice. Acest aranjament în spirală infirmă existenţa ciclurilor dicetopiperazinice, postulată de N. D. Zelinschi, sau a celor amidinpiperazinice, propusă de N. I. Gavrilov. Referindu-se la aceste cicluri, H. Vasiliu afirmă că acestea nu sînt preformate în molecula materiilor albuminice, ci „rezultă la operaţiile ulterioare". Faptul este azi pe deplin confirmat. O altă consecinţă a ipotezei constă în existenţa grupărilor N şi C terminale ale lanţurilor polipeptidice, ceea ce a fost recunoscut mult mai tîrziu experimental de către F. Sanger.

6. Se emite ipoteza că spiralele proteice se pot uni între ele prin intermediul grupărilor —COOH, —OH, $-NH_2$, =NH, —SH, formînd „pieliţe, fibre sau tuburi", azi pelicule, microtubuli etc., reprezentate plastic în figura 3, din care se remarcă asemănarea cu configuraţia „în pliant", propusă de L. Pauling şi R. B. Corey (22) pentru lanţurile polipeptidice (fig. 4).

7. După H. Vasiliu, aşezarea în spirală a proteinelor explică diferitele comportări ale acestora: „Ca şi o spirală de sîrmă, spirala fibrilei este elastică şi flexibilă, putînd, sub acţiunea agenţilor fizici (electricitate, căldură, tracţiune) şi a celor chimici (diverşi ioni, săruri), să se dilate, să se contracteze, să se mişte în diferite direcţii. Dacă ne uităm pe figura 1 (în prezenta lucrare, fig. 2 — *nota autorului*), vedem că spirala are 2 dungi cu grupe lipofile şi 4 dungi cu grupe hidrofile, corespunzătoare grupărilor —CO— şi —NH—. Ne putem închipui că fibrilele pot fi aranjate ca să dea suprafeţe lipofile sau hidrofile. Dungile hidrofile au polari-

tate deosebită, pozitivă sau negativă, corespunzătoare la —CO— sau —NH—. Dungile lipofile vor fi rele, pe cînd cele hidrofile vor fi bune conducătoare de electricitate. Probabil că și față de curentul nervos vor avea anumite comportări". Acest pasaj scoate în evidență sugestiile

Fig. 3. — Asocierea lanțurilor proteice în spirală, după H. Vasiliu (20).

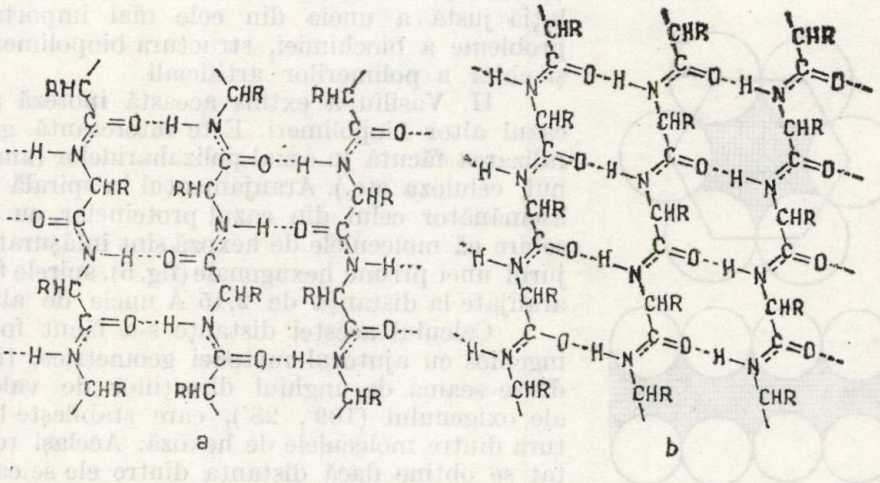


Fig. 4. — *a* și *b*, Asocierea lanțurilor proteice, după L. Pauling și R. B. Corey (22).

clarvăzătoare, noi pentru momentul cînd au fost formulate și care azi au devenit realități pline de consecințe în procesele ce se petrec în materia vie.

8. În aceeași lucrare se subliniază rolul important pe care îl va avea roentgenografia în verificarea ipotezei sale și în general în clarificarea structurii proteinelor. Spre exemplificare utilizează datele obținute de Brill, Meyer și Kratky (citați în lucrarea lui H. Vasiliu) în cazul roent-

genografiei fibroinei, din care rezultă că lanțul polipeptidic al acestei proteine nu poate fi aranjat decît în spirală. H. Vasiliu era contra structurii filiforme a lanțurilor polipeptidice. Cercetările recente au demonstrat că, și în cazul proteinelor așa-zise fibroase, lanțurile polipeptidice sînt așezate totuși în spirale cu pasul mare (ca în colagen).

Este interesant că savanți recunoscuți în acest domeniu, ca W. T. Astbury și F. O. Bell (23), M. L. Huggins (24) și L. Bragg, J. C. Kendrew și M. F. Perutz (25), au propus structuri lineare ale lanțurilor polipeptidice (bineînțeles în urma presupunerii lui H. Vasiliu), despre care L. Pauling afirmă că trebuie eliminate. În continuare, citățm un pasaj în sprijinul ipotezei sale: „Dacă jocul liber al forțelor naturii produce figuri artistice, cum îs cristalii, florile de gheață pe sticlă ori cele de gelatină, cu atît mai mult pot rezulta astfel de figuri regulate cînd intervine și protoplasma vie" ((20), p. 13).

9. H. Vasiliu mai discută problema, încă nerezolvată, cu privire la spațiul intramolecular al moleculei proteice. Întrebîndu-se dacă „este ceva în acest spațiu sau e vid?", ajunge la concluzia că spațiul din interiorul spiralei proteice este gol, valoarea mai mare a raportului O/N, întîlnită în cazul tuturor proteinelor, explicîndu-se nu prin înglobarea intramoleculară a apei, ci prin asocierea intermoleculară a acestora (fig. 5). Mai face ipoteza interesantă că acest gol intramolecular ar servi în protoplasma vie „la transport de energie, să zicem cea nervoasă. Poate că, dacă ipoteza lui Arthur Meyer ar fi adevărată, ar fi sediul vitulilor". Utilizînd, ca și L. Pauling, dar mult înaintea lui, metoda stohastică, apriorică, H. Vasiliu a reușit să găsească soluția justă a uneia din cele mai importante probleme a biochimiei, structura biopolimerilor și chiar a polimerilor artificiali.

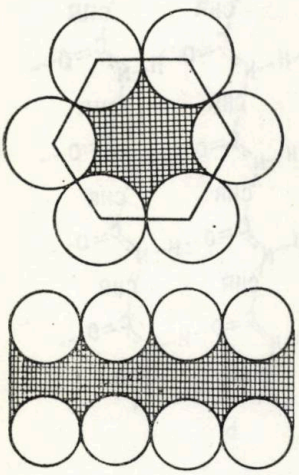


Fig. 5. — Spațiul intramolecular al spiralei proteice, după H. Vasiliu (20), reprezentat haşurat.

H. Vasiliu a extins această ipoteză și în cazul altor biopolimeri. Este interesantă generalizarea făcută în cazul polizaharidelor (amidonul, celuloza etc.). Aranjamentul în spirală este asemănător celui din cazul proteinelor, cu deosebire că moleculele de hexoză sînt înfășurate în jurul unei prisme hexagonale (fig. 6), spirele fiind aranjate la distanța de 2,15 Å unele de altele.

Calculul acestei distanțe s-a făcut foarte ingenios cu ajutorul metodei geometrice, ținîndu-se seama de unghiul direcțiilor de valență ale oxigenului (109°, 28′), care stabilește legătura dintre moleculele de hexoză. Același rezultat se obține dacă distanța dintre ele se calculează cu ajutorul volumului unei spire și al densității amidonului, metodă utilizată cu același succes și în cazul proteinelor.

Noutatea ipotezei lui H. Vasiliu cu privire la aranjamentul în spirală al lanțurilor polizaharidice reiese și din faptul că, în cel mai actual și complet tratat de biochimie publicat de D. E. Metzler ((26), p. 89 — 90), se afirmă că prima structură helicoidală a unui biopolimer, descoperită

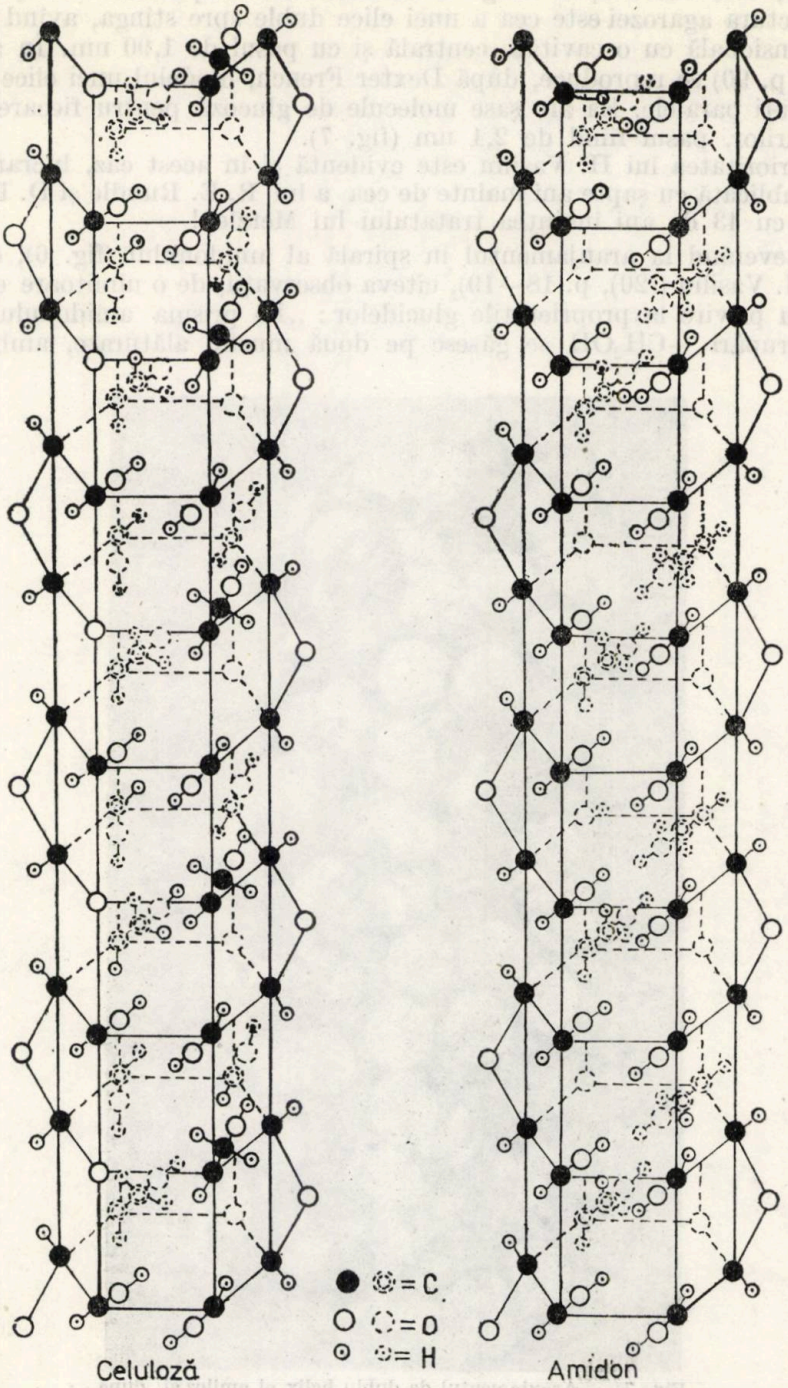


Fig. 6.—Aranjamentul în spirală al celulozei și amidonului, după H. Vasiliu (20).

în 1943, este elicea spre stînga a amilozei. Mai departe se menţionează că structura agarozei este cea a unei elice duble spre stînga, avînd o axă tridimensională cu o cavitate centrală şi cu pasul de 1,90 nm. În acelaşi tratat (p. 90) se reproduce, după Dexter French, modelul unei elice duble cu lanţuri paralele. Ea are şase molecule de glucoză pentru fiecare spiră a lanţurilor, pasul fiind de 2,1 nm (fig. 7).

Prioritatea lui H. Vasiliu este evidentă şi în acest caz, lucrarea lui fiind publicată cu şapte ani înainte de cea a lui R. E. Rundle şi D. French (27) şi cu 43 de ani înaintea tratatului lui Metzler!

Revenind la aranjamentul în spirală al amidonului (fig. 6), citǎm, după H. Vasiliu ((20), p. 18—19), cîteva observaţii, de o uimitoare exactitate, cu privire la proprietăţile glucidelor: „La prisma amidonului, cele două grupări $-CH_2OH$ se găsesc pe două muchii alăturate, ambele în

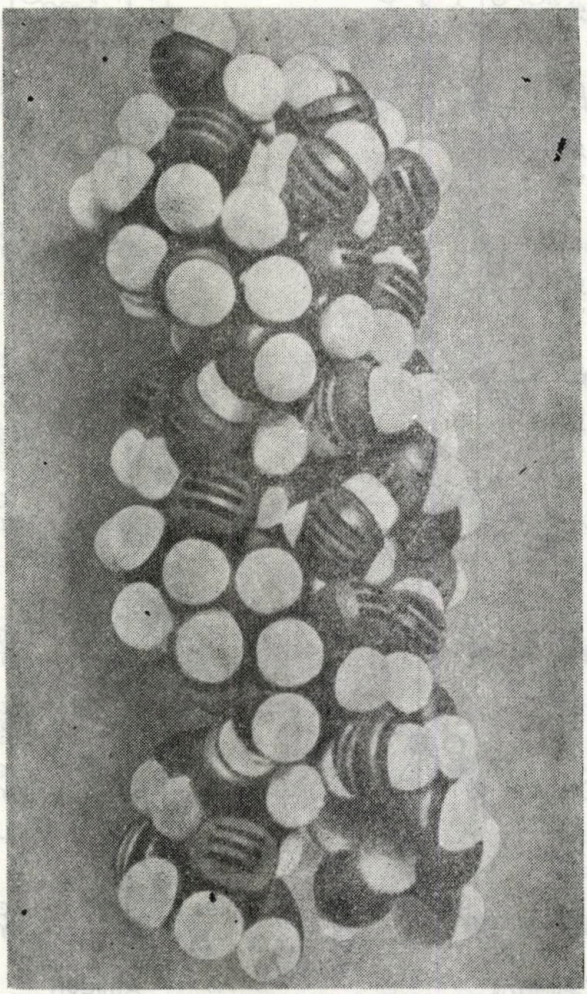


Fig. 7. — Aranjamentul de dublu helix al amilozei, după Dexter French (în (26), p. 90).

același spațiu, între hexagoane, pe cînd cele vecine nu au nici unul; la prisma celulozei, cele două grupări se găsesc pe două muchii opuse și cîte una în fiecare spațiu dintre hexagoane. Acest lucru ar explica, pe de o parte, posibilitatea prismelor de celuloză de a se lega unele de altele

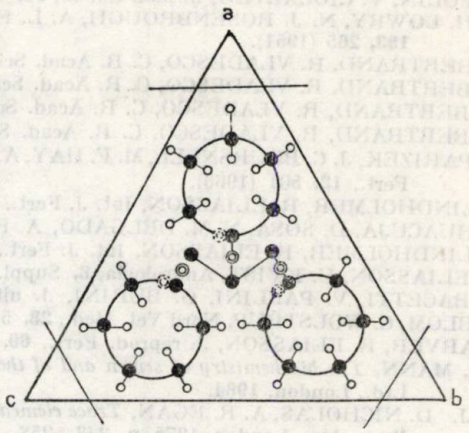


Fig. 8. — Schema tridimensională a unui triglicerid, după H. Vasiliu (20). Cercurile reprezintă secțiunea prin spirala acizilor grași, avînd raza de 1,4 Å.

spre a da pielițe (asocierea spiralelor, ca în schema lui French din figura 7 — *nota autorului*), iar pe de altă parte diferența de comportare la hidroliză dintre cele două substanțe".

Interesantă este și generalizarea făcută în cazul unor lipide, al trigliceridelor. Se presupune că lanțurile acizilor grași sînt aranjate în spirală, cu raza de 1,4 Å, distribuite simetric față de cei trei atomi de carbon ai glicerinei și legate prin intermediul oxigenului din gruparea —CO—O— (fig. 8).

Calculînd cu ajutorul acestui aranjament volumul unei unități structurale, cum este cea din figura 8, și împărțind la greutatea moleculară respectivă a trigliceridei, se obține densitatea trigliceridei, care demonstrează exactitatea ipotezei cu privire la dimensiunile spiralelor de acizi grași și la modul de grupare și legare cu glicerina ((20), p. 14—15). Acest aranjament spațial explică modul de distribuire a peliculelor de ulei pe suprafața apei și grosimea lor. Calculele privind grosimea peliculelor de ulei de la suprafața apei coincid cu cele făcute de Röntgen. Din ipotezele cu privire la hidrocarburile grele se deduce, după proprietățile lor lipo- și hidrofile, că și acestea au un aranjament spațial în elice. Problema, din păcate, a rămas în acest stadiu și merită a fi reluată de specialiști pentru explicarea numeroaselor particularități fizico-chimice ale lipidelor.

Din datele prezentate reiese că H. Vasiliu merită să dobîndească locul cuvenit în istoria uneia din cele mai importante teorii ale biochimiei.

Prezentat la redacție
la 8 ianuarie 1981

Facultatea de medicină veterinară
București, Splaiul Independenței nr. 105

BIBLIOGRAFIE

1. L. M. BURUIANĂ, *Contribuţia lui Haralambie Vasiliu la teoria structurii în spirală a proteinelor*, Consfătuirea de biochimie din 10—12 decembrie, Bucureşti, 1970.
2. E. RIEGLER, Zeitsch. analyt. Chem., **53**, 242 (1914).
3. A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL, M. M. DAVID, J. biol. Chem., **177**, 751 (1949).
4. O. FOLIN, V. CIOCÂLTEU, J. biol. Chem., **73**, 627 (1927).
5. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
6. G. BERTRAND, R. VLADESCO, C. R. Acad. Sci., Paris, **171**, 744 (1920).
7. G. BERTRAND, R. VLADESCO, C. R. Acad. Sci., Paris, **173**, 54 (1921).
8. G. BERTRAND, R. VLADESCO, C. R. Acad. Sci., Paris, **173**, 176 (1921).
9. G. BERTRAND, R. VLADESCO, C. R. Acad. Sci., Paris, **172**, 768 (1921).
10. J. PARIZEK, J. C. BOURSNELL, M. F. HAY, A. BABICKY, D. M. TAYLOR, J. Reprod. Fert., **12**, 501 (1966).
11. C. LINDHOLMER, R. ELIASSON, Int. J. Fert., **17**, 153 (1972).
12. L. HUACUJA, D. SOSA, N. M. DELGADO, A. ROSADO, Life Sciences, **13**, 1383 (1973).
13. C. LINDHOLMER, R. ELIASSON, Int. J. Fert., **19**, 56 (1974).
14. R. ELIASSON, U. KVIST, Andrologia, **8**, Suppl. 1, 119 (1976).
15. B. BACETTI, V. PALLINI, G. BURINI, J. ultrastruct. Res., **54**, 261 (1976).
16. E. BLOM, C. WOLSTRUP, Nord Vet. Med., **28**, 515 (1976).
17. S. ARVER, R. ELIASSON, J. reprod. Fert., **60**, 481 (1980).
18. TH. MANN, *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*, Methuen et Co., Ltd., London, 1964.
19. D. J. D. NICHOLAS, A. R. EGAN, *Trace elements in soil-plant-animals systems*, Academic Press, Inc., London, 1975, p. 243—258.
20. H. VASILIU, *Asupra configuraţiei moleculare a materiilor albuminoase grase şi a hidraţilor de carbon*, Com. Lab. chim. agric. al Fac. de ştiinţe agricole a Univ. Iaşi, vol. I, nr. 3, 5—21 (1936/37).
21. L. PAULING, R. B. COREY, H. R. BRANSON, Proc. nat. Acad. Sci., S.U.A., **37**, 205 (1951).
22. L. PAULING, R. B. COREY, Proc. nat. Acad. Sci., S.U.A., **37**, 251 (1951).
23. W. T. ASTBURY, F. O. BELL, Nature, **147**, 696 (1941).
24. M. L. HUGGINS, Chem. Rev., **32**, 195 (1943).
25. L. BRAGG, J. C. KENDREW, M. F. PERUTZ, Proc. roy. Soc. A, **203**, 321 (1950).
26. D. E. METZLER, în *Biochemistry. The chemical reactions of living cells*, Iowa State Univ., Academic Press, New York, 1977, p. 89—90.
27. R. E. RUNDLE, D. FRENCH, J. amer. Chem. Soc., **65**, 1710 (1943).

GLICOGENOLIZA ŞI GLICOLIZA ÎN INTOXICAŢIA EXPERIMENTALĂ CU CADMIU

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. S-a studiat acţiunea cadmiului administrat în experiment subcronic (0,5 mg Cd^{2+}/kg corp, 90 zile) şi subacut (5 mg Cd^{2+}/kg corp, 30 zile) asupra glicogenolizei şi glicolizei la şobolanul alb. Rezultatele obţinute în experimentul subacut au arătat o scădere semnificativă a glicogenului din ficat, rinichi şi glandele suprarenale, urmare a unei glicogenolize crescute, prin intensificarea activităţii glucozo-6-fosfatazei din ficat şi rinichi. De asemenea s-a observat o accentuare a proceselor de glicoliză anaerobă, evidenţiate prin creşterea piruvicemiei şi lactacidemiei. În experimentul subcronic s-a semnalat numai o scădere semnificativă a glicogenului din rinichi, ceilalţi parametri biochimici investigaţi fiind găsiţi în limitele lotului de animale-martor.

Cadmiul, poluant al mediului înconjurător, este cunoscut ca unul din cele mai toxice metale grele, constituind un factor de risc pentru sănătatea omului şi totodată periclitînd ecosistemul chiar în condiţii de concentraţii scăzute.

Mecanismul prin care cadmiul îşi exercită efectele sale toxice, îndeosebi la nivelul metabolismelor intermediare, nu este pe deplin elucidat, iar datele care să evidenţieze punctele de atac ale cadmiului la diferite nivele, verigi metabolice, sînt încă lacunare.

Deşi numeroase cercetări (1), (2), (3), (4), (5), (6), precum şi lucrările noastre precedente (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14) au evidenţiat acţiunea toxică specifică a cadmiului asupra metabolismului glucidic, concluziile nu au reuşit încă să definească cu certitudine efectul toxic la nivelul acestui parametru metabolic.

Datele se consideră a fi insuficiente, disparate şi deseori contradictorii, datorită condiţiilor experimentale diferite (doză, cale de administrare, durată de expunere, specie etc.).

În lucrarea de faţă ne-am propus să studiem acţiunea cadmiului, administrat în concentraţii şi pe căi diferite, asupra unor parametri biochimici la nivelul glicogenolizei (glicogen, glucozo-6-fosfatază din ficat şi rinichi) şi glicolizei anaerobe (acid lactic şi piruvic din sînge) la şobolanul alb.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe şobolani albi, femele, cu greutate iniţială de 160—180 g. S-au folosit două variante experimentale:

I. Experimentul subcronic — realizat prin administrarea unei doze mici de cadmiu, de 0,5 mg Cd^{2+}/kg corp, per oral în apă, prin sondă intragastrică, zilnic, timp de 90 de zile.

Acest experiment ar putea prefigura consecinţele unui posibil aport de cadmiu, provenit prin poluarea factorilor de mediu (apă, aer, alimente).

II. Experimentul subacut — care a urmărit acţiunea unei doze mari de cadmiu, de 5 mg Cd^{2+}/kg corp, administrat subcutan, săptămînal, timp de 30 de zile, doză ale cărei efecte ar putea fi asemuite unei expuneri profesionale în condiţii industriale.

Pentru fiecare model experimental s-au folosit loturi de animale-martor după cum urmează:

— pentru experimentul subcronic, animalele-martor au fost tratate cu apă de robinet prin sondă intragastrică;

— pentru experimentul subacut, animalele-martor au fost injectate subcutan cu ser fiziologic.

Înainte de sacrificare, animalele au fost anesteziate cu nembutal (5 mg/kg corp) prin administrarea intraperitoneală. Sacrificarea animalelor s-a făcut prin secţionarea aortei abdominale. S-a determinat glicogenul din ficat, rinichi şi glandele suprarenale, după metoda Montgomery (15). Activitatea glucozo-6-fosfatazei (G-6-P-azei) din ficat şi rinichi s-a evaluat după metoda Harper (16). Acidul lactic şi acidul piruvic din sînge au fost determinaţi prin metoda enzimatică (17).

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic, folosindu-se media aritmetică ($\bar{x}$), deviaţia standard (σ), testul de probabilitate (p).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum reiese din tabela 1 şi figura 1, în cazul experimentului subcronic (deci al dozelor de lungă durată) are loc o scădere semnificativă a glicogenului numai în rinichi.

Tabela 1

Conţinutul de glicogen (µg/100 g ţesut umed) în ficat, rinichi şi glandele suprarenale la şobolani trataţi cu cadmiu

Organ	Experiment subcronic		Experiment subacut	
	martor	intoxicat	martor	intoxicat
Ficat	$\bar{x}=2239\pm374$ (10)	$\bar{x}=2185\pm381$ $p>0,5$ (13)	$\bar{x}=1805\pm130$ (12)	$\bar{x}=813\pm96$ $p<0,01$ (12)
Rinichi	$\bar{x}=101\pm31$ (10)	$\bar{x}=74\pm10$ $p<0,01$ (10)	$\bar{x}=92\pm9$ (10)	$\bar{x}=70\pm20$ $p<0,01$ (10)
Suprarenale	$\bar{x}=135\pm27$ (10)	$\bar{x}=146\pm8$ $p>0,01$ (10)	$\bar{x}=130\pm24$ (10)	$\bar{x}=96\pm22$ $p<0,01$ (12)

Notă: p = semnificaţia diferenţelor dintre medii; cifrele din paranteză reprezintă numărul de animale tratate.

Aceste date sînt în acord cu alte rezultate obţinute de noi (12), care au relevat la această doză existenţa unor modificări histopatologice la nivelul tubilor contorţi proximali, caracteristice unei tubulonefroze toxice.

Scăderea glicogenului renal la această doză ar putea fi rezultatul unui consum energetic crescut, urmare a intensificării proceselor de reab-

sorbţie tubulară, procese active care au loc la acest nivel şi evidenţiază în acelaşi timp sensibilitatea crescută a acestui organ, apreciat ca fiind organul-ţintă al cadmiului.

În cazul experimentului subacut (doză mare de cadmiu) s-au pus în evidenţă o scădere accentuată a glicogenului din ficat, rinichi şi glandele

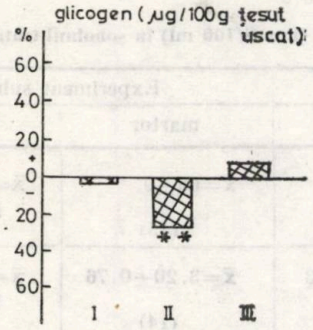


Fig. 1. — Modificările procentuale faţă de animalele-martor ale cantităţii de glicogen din: I — ficat; II — rinichi; III — glandele suprarenale la animalele tratate cu cadmiu (experiment subcronic).
** $p < 0,01$

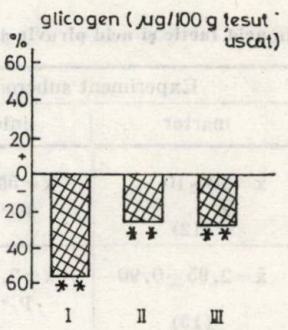


Fig. 2. — Modificările procentuale faţă de animalele-martor ale cantităţii de glicogen din: I — ficat; II — rinichi; III — glandele suprarenale la animalele tratate cu cadmiu (experiment subacut).
** $p < 0,01$

suprarenale (tabela 1, fig. 2) şi o creştere a activităţii G-6-P-azei din ficat şi rinichi (tabela 2, fig. 3).

Scăderea glicogenului din ficat şi rinichi sub acţiunea dozelor mari de cadmiu se apreciază a fi consecinţa unei glicogenolize accentuate, urmare a creşterii activităţii G-6-P-azei din aceste două organe şi a unui deficit de sinteză de glicogen din produşi de origine neglucidică (lipide), fapt

Tabela 2

Activitatea glucozo-6-fosfatazei (µmoli P.a./min/g) în ficat, rinichi şi glandele suprarenale la şobolani trataţi cu cadmiu

Felul experimentului	Ficat		Rinichi	
	martor	intoxicat	martor	intoxicat
Experiment subcronic	$\bar{x}=13,0\pm2,3$ (10)	$\bar{x}=13,01\pm1,97$ $p>0,5$ (10)	$\bar{x}=13,88\pm1,54$ (10)	$\bar{x}=14,33\pm1,90$ $p>0,5$ (10)
Experiment subacut	$\bar{x}=12,09\pm1,8$ (10)	$\bar{x}=14,83\pm1,4$ $p<0,01$ (10)	$\bar{x}=12,73\pm3,0$ (10)	$\bar{x}=15,20\pm3,0$ $p<0,01$ (10)

ce confirmă datele noastre anterioare privind modificările provocate de cadmiu la nivelul gluconeogenezei din glicerol (11).

După cum reiese din tabela 3 şi figurile 4 şi 5, concentraţiile mici de cadmiu nu provoacă modificări semnificative ale piruvicemiei şi lactacidemiei.

Tabela 3

Conţinutul în acid lactic şi acid piruvic din sînge (µmoli/100 ml) la şobolani trataţi cu cadmiu

Parametrii urmăriţi	Experiment subcronic		Experiment subacut	
	martor	intoxicat	martor	intoxicat
Acid lactic	$\bar{x}=60\pm10$ (12)	$\bar{x}=56\pm10$ $p>0,5$ (10)	$\bar{x}=68\pm9$ (15)	$\bar{x}=104\pm15$ $p<0,01$ (10)
Acid piruvic	$\bar{x}=2,95\pm0,90$ (13)	$\bar{x}=2,70\pm0,83$ $p>0,5$ (10)	$\bar{x}=3,20\pm0,76$ (14)	$\bar{x}=6,90\pm2,0$ $p<0,01$ (10)

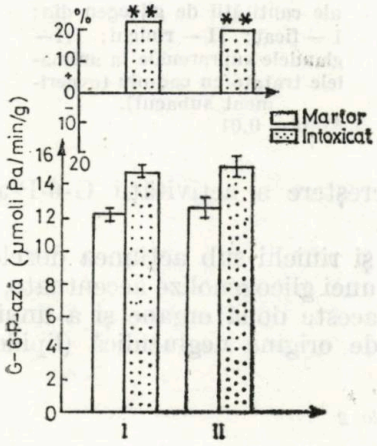


Fig. 3. — Valorile medii şi modificările procentuale faţă de martor ale activităţii G-6-P-azei din: I—ficat; II—rinichi la animalele tratate cu cadmiu (experiment subacut).
** $p < 0,01$

În schimb, dozele mari (experiment subacut) cauzează o creştere semnificativă atît a acidului lactic cît şi a acidului piruvic (tabela 3, fig. 4 şi 5) comparativ cu lotul de animale-martor.

Creşterea acestor produşi finali ai glicolizei anaerobe evidenţiază faptul că în expunerea subacută la cadmiu are loc o accentuare a proceselor anaerobiotice de degradare a glucozei şi o insuficientă transformare a acidului lactic în glucoză prin procese de neoformare, datorită afectării celulelor hepatice şi renale, epuizate energetic sub acţiunea toxică a cadmiului.

Rezultatele obţinute de noi în lucrări anterioare (7), (12), (14) privind acţiunea toxică a cadmiului asupra funcţiei glandelor suprarenale au evidenţiat o creştere a reactivităţii acestora şi o scădere a activităţii

secretorii a pancreasului. Or, este cunoscut că hormonii glucocorticoizi inhibă decarboxilarea oxidativă şi consumul periferic al piruvatului, ducînd la transformarea piruvatului în lactat, cu creşterea lactacidemiei şi piruvicemiei (18).

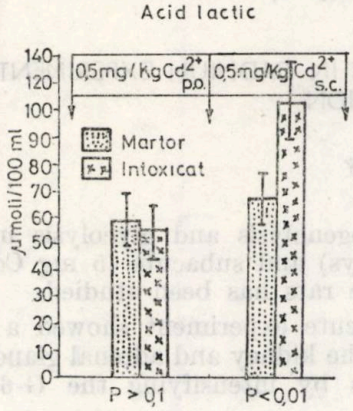


Fig. 4. — Valorile medii ale cantităţilor de acid lactic din sînge la şobolani trataţi cu cadmiu (experiment subcronic şi subacut) comparativ cu valorile medii ale animalelor-martor.

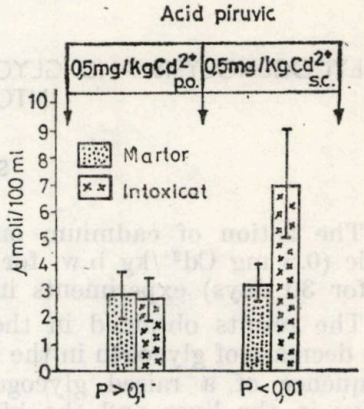


Fig. 5. — Valorile medii ale cantităţilor de acid piruvic din sînge la şobolani trataţi cu cadmiu (experiment subcronic şi subacut) comparativ cu valorile medii ale animalelor-martor.

S-a demonstrat de asemenea că în condiţiile hiperfuncţiei suprarenale şi în stare de diabet are loc o eliberare masivă de acizi graşi liberi din ţesutul adipos, fapt care ar duce la inhibarea fosforilării şi oxidării periferice a glucozei (19), (20), în urma cărora lactacidemia şi piruvicemia se intensifică.

Cantitatea crescută a acestor metaboliţi în sînge (acid lactic şi piruvic) se poate normaliza numai dacă există o cantitate suficientă de insulină pentru un transport adecvat al glucozei în celule.

În acest context, se poate presupune că creşterea piruvicemiei şi a lactacidemiei ar putea fi cauzată de acţiunea toxică directă a cadmiului asupra acestor organe.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obţinute în ambele modele experimentale se poate deduce că:

Expunerea la concentraţii mici de cadmiu (experiment subcronic) provoacă o scădere semnificativă a glicogenului din rinichi, evidenţiindu-se sensibilitatea crescută a acestui organ faţă de concentraţiile mici de cadmiu.

Sub acţiunea dozelor mari de cadmiu (experiment subacut) are loc o creştere a glicogenolizei hepatice şi renale, manifestată prin scăderea glicogenului şi prin intensificarea activităţii G-6-P-azei din aceste organe.

Dozele mari de cadmiu, administrate în experiment subacut, determină o accentuare a glicolizei, evidenţiată prin creşterea piruvicemiei şi a lactacidemiei.

Prezentat la redacţie
la 7 octombrie 1980

Institutul de igienă şi sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

GLYCOGENOLYSIS AND GLYCOLYSIS IN CADMIUM EXPERIMENTAL INTOXICATION

SUMMARY

The action of cadmium on glycogenolysis and glycolysis in subchronic (0.5 mg Cd^{2+}/kg b.w. for 90 days) and subacute (5 mg Cd^{2+}/kg b.w. for 30 days) experiments in white rats has been studied.

The results obtained in the subacute experiment showed a significant decrease of glycogen in the liver, the kidney and adrenal glands as a consequence of a raised glycogenolysis by intensifying the G-6-P-ase activity in the liver and the kidney.

Also an increase of anaerobiotic glycolysis processes was evidenced by an augumentation of pyruvicemia and lactacidemia.

A significant glycogen decrease in the kidney in the subchronic experiment was noted without other modifications of biochemical parametres.

BIBLIOGRAFIE

1. T. GHAFGHAZI, J. H. MENNEAR, Toxicol. appl. Pharmaceut., **31**, 134—142 (1975).
2. R. L. SINGHAL, Science, **183**, 1094—1096 (1976).
3. R. L. SINGHAL, Z. MERALI, P. D. HEDINA, Science, **35**, 75—80 (1974).
4. A. SPORN, I. DINU, Igiena, **19**, *4*, 201—208 (1970).
5. D. W. FASET, Ann. Rev. Pharm., **15**, 109—111 (1975).
6. L. ANDRI, T. PILAT, Lav. Umano, **15**, *11*, 495 (1963).
7. S. GABOR, Z. ANCA, V. V. PAPILIAN, F. GRECU, Arch. Mal. prof., **34**, 641—646 (1974).
8. Z. ANCA, St. cerc. biochim., **16**, *1*, 5—8 (1973).
9. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **18**, 5—8 (1975).
10. Z. ANCA, S. GABOR, V. V. PAPILIAN, Igiena, **25**, 67—72 (1976).
11. Z. ANCA, I. DEACIUC, E. PORA, St. cerc. biol., Seria biol. anim., **30**, 61—64 (1978).
12. Z. ANCA, teză de doctorat, Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, 1979.
13. Z. ANCA, S. GABOR, Al 19-lea Congres internaţional de medicina muncii, Dubrovnic, 1978, Abstract, p. 28.
14. Z. ANCA, S. GABOR, în Second International Congress on Toxicology, Brussel (Belgium), 1980, Toxicology letters, p. 137.
15. R. MONTGOMERY, Arch. Biochem. Biophys., **67**, 378—386 (1957).
16. H. U. BERGMEYER, *Method of enzymatic analysis*, Academic Press, New York — London, 1963, p. 788—792.
17. R. RICHTERICH, *Chimie clinique théorique et pratique*, Doin, Paris, 1967.
18. S. S. FAJANUS, Metabolism, **10**, 951 (1961).
19. P. D. RAY, O. D. FOSTER, H. A. LARDY, J. biol. Chem., **239**, *10*, 3396 (1964).
20. N. HAVU, Acta anal., Suppl., **139**, 1—23 (1969).

STUDIUL ACŢIUNII UNOR IONI METALICI ASUPRA ACTIVITĂŢILOR CATALITICE ALE α-CHIMOTRIPSINEI LIBERE ŞI IMOBILIZATE PE SEPHAROSE 4 B, ACTIVATĂ CU BrCN

DANIELA BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED

Rezumat. Se prezintă rezultatele obţinute în studiul efectului ionilor de Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} şi Ca^{2+} asupra activităţilor proteolitică şi esterazică ale unui preparat imobilizat al α-Cht realizat prin legarea covalentă a acesteia de Sepharose 4 B. Preparatul imobilizat avea un conţinut proteic de 0,8 mg/ml gel, o activitate proteolitică reziduală de 42% şi o activitate esterazică reziduală de 73%.

Prin imobilizare, α-Cht îşi măreşte stabilitatea faţă de acţiunea inhibitoare a sărurilor metalelor studiate atît în cazul activităţii ei proteolitice, cît şi în cel al activităţii esterazice. Se constată totodată că efectul de protejare faţă de agenţii inhibitori studiaţi, apărut în urma imobilizării enzimei, este mai pronunţat în cazul activităţii proteolitice şi mai redus în cazul activităţii esterazice. Aşa, de pildă, valoarea constantelor de inhibiţie poate creşte pînă de trei ori (Hg^{2+}) sau chiar de şase ori (Pb^{2+}) în cazul activităţii proteolitice în urma imobilizării α-Cht, dar creşte numai cel mult cu 73% (Pb^{2+}) în cazul activităţii esterazice. Modificările apărute în comportarea α-Cht în urma imobilizării ei faţă de acţiunea ionilor metalici studiaţi depind atît de natura acestora, cît şi de activitatea catalitică urmărită.

Studierea comportării enzimelor imobilizate faţă de o serie de ioni metalici a devenit o problemă tot mai actuală, mai ales de cînd acestea au dobîndit reale şanse de aplicare în practică sau sînt chiar aplicate deja în reactoare enzimatice din industriile alimentară, farmaceutică sau chimică (1). Metale ca mercur, plumb, cupru, cadmiu, cobalt, aluminiu şi altele pot proveni atît din părţile metalice ale instalaţiilor industriale, cît şi din materii prime, soluţii tampon, ape de spălare etc. Chiar dacă ionii metalici există doar sub formă de urme în mediul de reacţie, datorită funcţionării relativ îndelungate a unui reactor enzimatic, ei vor avea timp suficient să se acumuleze şi să-şi manifeste la un moment dat acţiunea lor specifică.

Se ştie că metalele grele pot reacţiona cu o serie de grupări funcţionale din molecula enzimelor, inactivîndu-le. Mercurul, de pildă, posedă numeroase posibilităţi de a reacţiona cu molecula enzimei. El poate da complecşi de coordonare polifuncţională cu o serie de grupări ale enzimei sau poate reacţiona numai cu grupări sulfhidrilice, imidazolice sau carboxilice (2). Interacţiunea poate avea loc direct la nivelul centrului catalitic activ, urmată de o inactivare totală a enzimei, sau la o altă parte conformaţională a moleculei, urmată fie de o inactivare parţială, fie de una totală. Mercurul poate chiar disloca metalele din metal-enzime, inactivîndu-le (3). Mercurul — dar probabil şi alte metale grele — poate induce, în sfîrşit, şi modificări în conformaţia enzimei, reacţionînd cu

grupări chimice care sînt esențiale în păstrarea structurii moleculei proteice (4), (5).

Prin imobilizare, enzimele dobîndesc, după cum se știe, o serie de proprietăți noi, printre care se numără și o rezistență mai crescută față de agenți fizici sau chimici cu acțiune inhibitoare, cum sînt variații mai mari de pH, temperaturi mai ridicate, inhibitori naturali sau de sinteză etc. Dintre acești agenți fac parte și o serie de ioni metalici, mai ales cei care aparțin metalelor grele. Am putut constata și noi de repetate ori la numeroase enzime imobilizate acest fapt (6)—(10), care se poate explica printr-o stabilizare a structurii macromoleculei proteice a enzimei în urma legării ei covalente de suportul insolubil (11).

În lucrarea de față studiem, în continuarea unei lucrări anterioare (12), modificările apărute în comportarea α-chimotripsinei (α-Cht) (EC 3.4.4.5) în urma imobilizării ei față de o serie de ioni metalici, cum sînt Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} și Ca^{2+}, atît în cazul activității proteolitice cît și în cel al activității esterazice.

MATERIAL ȘI METODE

În prezenta lucrare am folosit α-Cht din pancreas bovin în stare liofilizată (Biofarm, București), iar ca suport insolubil pentru imobilizarea ei Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suedia), care a fost activată cu BrCN (Merck—Schuchardt, Hohenbrunn, R. F. Germania). Drept substrat pentru urmărirea activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate s-a folosit cazeina Hammarsten (Fluka AG, Buchs, Elveția), iar pentru determinarea activității esterazice a celor două preparate enzimatice N-benzoil-L-tirozin-etil-ester (BTEE) (Sigma, Chemical Company, S.U.A.). Acidul tricloracetic utilizat pentru stoparea reacției enzimatice a α-Cht libere a provenit de la firma Carlo Erba (Italia). Reactivii pentru prepararea soluției tampon (acid boric, borax și HCl) și sărurile metalelor luate în studiu ($HgCl_2$, $(CH_3—COO)_2Pb$, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, $AlCl_3$ și $CaCl_2$) au provenit de la Întreprinderea Reactivul (București). Pentru prepararea tamponului Tris—HCl s-a folosit Tris-hidroximetilaminometan de la firma Loba Chemie Wien—Fischamend (Austria).

Cuplarea α-Cht de Sepharose 4 B activată cu BrCN. Înaintea cuplării α-Cht de Sepharose 4 B, aceasta din urmă a fost activată cu BrCN, după indicațiile date de Axén și Porath (13). În acest scop s-au folosit 20 ml gel de Sepharose 4 B și 200 mg BrCN, dizolvați în 25 ml apă distilată. Gelul proaspăt activat și bine spălat s-a tratat apoi la temperatura camerei cu 15 mg α-Cht dizolvate în 8 ml soluție $NaHCO_3$ 0,1 M. A doua zi, conjugatul enzimatic rezultat a fost spălat pe o pîlnie Büchner la trompă de apă de mai multe ori alternativ cu o soluție de NaCl 0,5 M și apă distilată pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate; pînă la folosire se păstrează la 3—4°C, suspendat în apă distilată. Cantitatea de enzimă legată de suportul insolubil s-a determinat prin spectrofotometrarea soluției enzimatice la 280 nm, înainte și după reacția de cuplare.

Determinarea activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate în absența și în prezența ionilor de Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} și Ca^{2+}. S-a lucrat după metoda indicată de Kunitz (14) pentru tripsină și modificată de Schwert și Takenaka (15) pentru α-Cht, folosindu-se ca substrat cazeina Hammarsten. S-a procedat după cum urmează: peste 1 ml soluție 1% de cazeină, în tampon borat 0,1 M, pH 8,0, s-a adăugat 0,1 ml soluție 0,0025% de α-Cht în HCl 0,001 M sau 0,05 ml gel enzimatic suspendat în 0,1 ml apă distilată. Apoi s-a adus volumul de reacție la 2 ml prin adăugare de 0,9 ml soluție de tampon borat, care poate să conțină sau nu cantitățile amintite mai jos ale sărurilor metalelor studiate. În cazul $HgCl_2$, $(CH_3—COO)_2Pb$, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ și $AlCl_3$, cei 0,9 ml soluție tampon conțineau cantități crescînde din aceste săruri, și anume 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 și 10 μmoli, iar în cazul $CaCl_2$ 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 și 12,5 mmoli. Amestecul de reacție a fost apoi incubat timp de 20 min la 37°C, agitîndu-se din cînd în cînd. Reacția enzimatică a fost stopată prin adăugarea de 3 ml acid tricloracetic 5%. S-au agitat bine probele și, după un repaus de 20 min la temperatura camerei și o prealabilă filtrare, s-au determinat produșii de hidroliză rezultați prin spectrofotometrare la 280 nm. Extincțiile citite au fost

transformate cu ajutorul unei curbe etalon în μmoli tirozină. Activitatea proteolitică s-a exprimat în μmoli tirozină/min/mg enzimă.

În vederea stabilirii constantelor de inhibiţie (K_i) ale sărurilor studiate prin metoda grafică a lui Dixon, s-a determinat activitatea proteolitică şi la o a doua concentraţie de substrat, şi anume la 0,5 % cazeină.

Cunoscînd rolul important al ionilor de Ca^{2+} în activitatea proteolitică a α-Cht libere şi pentru a surprinde eventuale modificări apărute după imobilizare în comportarea ei faţă de aceşti ioni, am urmărit comparativ activitatea proteolitică a enzimei libere şi imobilizate şi în prezenţa şi absenţa clorurii de calciu. Cantităţile enzimei folosite în reacţie au fost în cazul α-Cht libere de 5, 10, 15, 20 şi 25 μg şi în cazul α-Cht imobilizate de 40, 80, 120, 160, 200 şi 240 μg, iar cantitatea de $CaCl_2$ adăugată probei a fost de 5 mmoli, ceea ce corespunde la o concentraţie de 2,5 M $CaCl_2$.

Determinarea activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate în absenţa şi în prezenţa ionilor de Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} şi Ca^{2+}. Pentru determinarea activităţii esterazice a enzimei libere şi imobilizate s-a folosit drept substrat BTEE, ţinîndu-se seama de indicaţiile date de Hummel (16) şi procedîndu-se astfel: într-o cuvă de cuarţ s-a pipetat 1,4 ml soluţie BTEE 0,66 mM în tampon Tris—HCl 0,08 M, pH 7,8, care conţine şi 0,1 M $CaCl_2$. Apoi s-a adăugat 1,5 ml soluţie tampon Tris—HCl, care poate să conţină sau nu cantităţile amintite mai jos ale sărurilor metalelor studiate. Astfel, în cazul $HgCl_2$ şi $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, cei 1,5 ml soluţie tampon Tris—HCl conţineau 1, 3, 5, 7, 9 şi 10 μmoli, iar în cazul $(CH_3—COO)_2Pb$ şi $AlCl_3$ 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1 şi 1,3 μmoli. Pentru urmărirea efectului ionului de Ca^{2+}, cei 1,5 ml soluţie tampon adăugaţi amestecului de reacţie conţineau 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 sau 2,0 mmoli $CaCl_2$. În sfîrşit, s-a adăugat 0,1 ml soluţie 0,006 % de α-Cht liberă sau 0,05 ml gel enzimatic suspendat în 0,1 ml apă distilată şi s-a citit extincţia la 256 nm în momentul adăugării enzimei şi după 5 min de reacţie la 25°C (la proba cu enzimă imobilizată, extincţia s-a citit înaintea adăugării gelului enzimatic). Proba martor conţinea, în locul enzimei, un volum egal (0,1 ml) de HCl 0,001 N. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unităţi/mg şi s-a calculat cu ajutorul formulei:

$$\text{unităţi/mg} = \frac{A_{256}/\text{min} \times 1000}{964 \times \text{mg/ml în probă}},$$

unde A_{256} reprezintă creşterea absorbţiei la 256 nm şi la 25°C.

Pentru stabilirea constantelor de inhibiţie (K_i) ale sărurilor metalelor luate în studiu după metoda grafică a lui Dixon, s-a determinat activitatea esterazică a α-Cht libere şi imobilizate şi la o a doua concentraţie de substrat, şi anume la 0,33 mM BTEE.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin legarea covalentă a α-Cht de Sepharose 4 B activată cu BrCN s-a obţinut un preparat enzimatic insolubil catalitic activ cu un conţinut proteic de 0,8 mg/ml gel. Activitatea proteolitică reziduală a preparatului obţinut a fost de 42 %, iar cea esterazică reziduală de 73 %. Aceste valori concordă foarte bine cu datele obţinute de noi într-o lucrare anterioară (12), în care α-Cht a fost imobilizată pe un gel perlat de agaroză reticulată. Şi în acest caz activitatea esterazică reziduală este considerabil mai ridicată decît cea proteolitică reziduală, ceea ce confirmă constatarea făcută şi de alţi autori (17), (18), (19), şi anume că o enzimă imobilizată care acţionează atît asupra unor substrate macromoleculare, cît şi asupra unor substrate cu greutate moleculară mică are o activitate enzimatică reziduală mai mare faţă de substratul cu greutate moleculară mică şi invers. Această comportare este atribuită unor factori sterici care apar în urma imobilizării enzimei pe suportul insolubil.

Din datele experimentale obţinute în studiul acţiunii sărurilor de mercur, plumb, cupru şi aluminiu asupra activităţii proteolitice şi este-

razice a α-Cht libere și imobilizate, rezultă foarte clar că prin imobilizare α-Cht devine mai rezistentă la acțiunea inhibitoare a ionilor metalici studiați. Se observă de asemenea, tot ca o constatare general valabilă, că mărirea stabilității față de acțiunea de inhibiție a ionilor metalici în urma imobilizării este mai pronunțată în cazul activității proteolitice, în comparație cu activitatea esterazică.

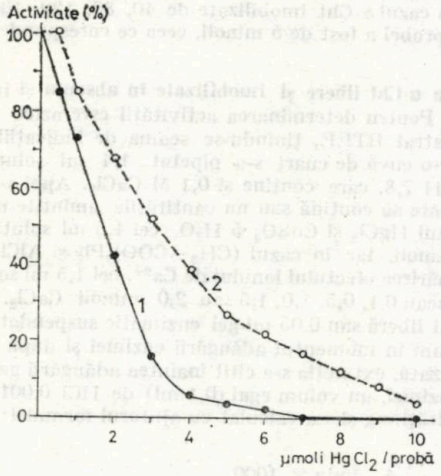


Fig. 1. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (*1*) și imobilizate (*2*) în funcție de concentrația ionilor de $Hg^{2+}(HgCl_2)$.

În continuare, prezentăm în mod succint, pentru fiecare metal în parte, modul în care se repercutează prezența sa în mediul de incubare asupra activității proteolitice și esterazice atît în cazul α-Cht libere, cît și în cel al enzimei imobilizate prin legarea ei covalentă de agaroză.

Din figura 1 rezultă influența diferitelor concentrații de $HgCl_2$ asupra activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate. Se observă în ambele cazuri o scădere treptată a activității enzimatice pe măsura creșterii cantității sării mercurice în mediul de incubare. Enzima imobilizată prezintă însă o sensibilitate mult mai scăzută față de acest inhibitor în comparație cu cea liberă. Astfel, în timp ce enzima liberă își pierde 85% din activitatea ei inițială în prezența a 3 µmoli $HgCl_2$ în mediul de reacție, cea imobilizată își păstrează în aceste condiții peste 50% din activitatea ei. La o cantitate de 7 µmoli $HgCl_2$ în probă, cînd enzima liberă și-a pierdut complet activitatea ei proteolitică, cea imobilizată mai păstrează încă 18% din activitate. Odată cu creșterea în continuare a cantității de $HgCl_2$ în mediul de reacție, enzima imobilizată își micșorează treptat activitatea, păstrînd totuși chiar la o cantitate de 10 µmoli $HgCl_2$ în probă (ceea ce corespunde la o concentrație de $HgCl_2$ 5 mM) un rest de activitate de 4—5%.

În cazul ionului de Pb^{2+}, diagramele de inhibiție au un aspect mai particular (fig. 2), în sensul că se observă, odată cu creșterea treptată a cantității de acetat de plumb din probă, o scădere practic paralelă a activităților proteolitice ale celor două preparate de enzimă. Dar și de data aceasta scăderea activității proteolitice a enzimei imobilizate este

mai puţin accentuată în comparaţie cu cea liberă, activitatea enzimei imobilizate prezentînd la concentraţii ale acetatului de plumb cuprinse între 1 şi 5 μmoli/probă întotdeauna activităţi cu 15% mai crescute decît enzima liberă. Chiar şi la 10 μmoli $(CH_3—COO)_2Pb$ în probă, cînd

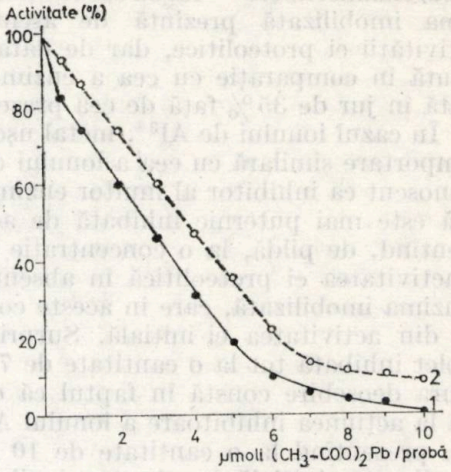


Fig. 2. — Variaţia activităţii proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate (*2*) în funcţie de concentraţia ionilor $Pb^{2+}((CH_3—COO)_2Pb)$.

enzima liberă este complet inhibată, cea imobilizată mai prezintă încă o activitate de aproape 10% din cea iniţială.

În figura 3 sînt reprezentate variaţiile activităţilor proteolitice ale α-Cht libere şi imobilizate în funcţie de diferite concentraţii ale sulfatului de cupru. În cazul enzimei libere se observă mai întîi o scădere relativ

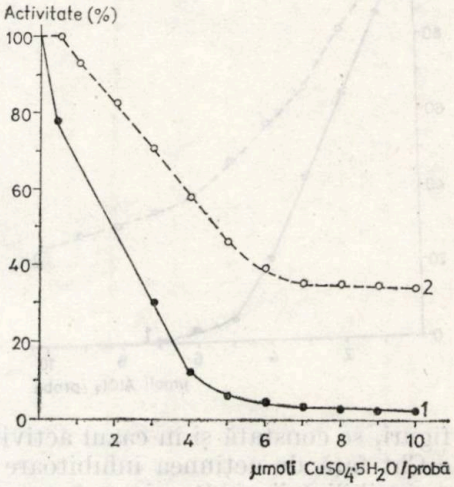


Fig. 3. — Variaţia activităţii proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate (*2*) în funcţie de concentraţia ionilor de $Cu^{2+}(CuSO_4 \cdot 5\ H_2O)$.

bruscă a activităţii proteolitice, care apoi, începînd cu cantităţi de 5—6 μmoli $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$/probă, tinde asimptotic spre zero. În cazul enzimei imobilizate, scăderea activităţii proteolitice este mult mai puţin spectaculoasă la concentraţii pînă în jur de 5 μmoli $CuSO_4 \cdot 5H_2O$/probă. Ea

posedă, de pildă, în prezența a 4 μmoli $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în probă, o activitate de aproape 60% din cea fără inhibitor, în timp ce enzima liberă mai posedă în aceste condiții doar 12% din activitatea ei în absența ionului de Cu^{2+}. Interesant de amintit mai este și faptul că, începînd — ca și în cazul enzimei libere — tot cu cantități de 5—6 μmoli $CuSO_4 \cdot 5H_2O$/ probă, enzima imobilizată prezintă de asemenea o tendință de plafonare a activității ei proteolitice, dar de data aceasta la o activitate mult mai crescută în comparație cu cea a enzimei libere, și anume la o activitate situată în jur de 35% față de cea prezentată în absența ionului de Cu^{2+}.

În cazul ionului de Al^{3+}, metal ușor, se constată în mod surprinzător o comportare similară cu cea a ionului de Hg^{2+}, metal greu prin excelență și cunoscut ca inhibitor al multor enzime (fig. 4). Și de astă dată enzima liberă este mai puternic inhibată de acest ion decît enzima imobilizată, prezentînd, de pildă, la o concentrație de 4 μmoli $AlCl_3$/probă doar 20% din activitatea ei proteolitică în absența ionului de Al^{3+}, spre deosebire de enzima imobilizată, care în aceste condiții mai păstrează încă aproape 60% din activitatea ei inițială. Surprinzător este că enzima liberă este complet inhibată tot la o cantitate de 7 μmoli/probă, ca și în cazul $HgCl_2$. Singura deosebire constă în faptul că enzima imobilizată este mai rezistentă la acțiunea inhibitoare a ionului Al^{3+} în comparație cu cea a ionului Hg^{2+}, prezentînd la o cantitate de 10 μmoli $AlCl_3$/probă o activitate de 25% din cea inițială în absența ionilor de Al^{3+}.

Figurile 5, 6 și 7 reprezintă variația activităților esterazice ale α-Cht libere și imobilizate în funcție de concentrații crescînde ale sărurilor de mercur, plumb și cupru în mediul de incubare. După cum rezultă din

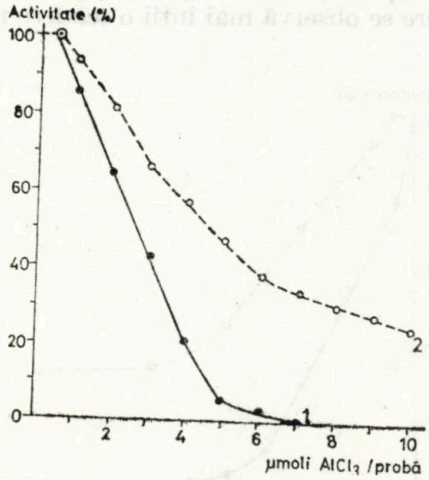


Fig. 4. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (*1*) și imobilizate (*2*) în funcție de concentrația ionilor de Al^{3+}($AlCl_3$).

aceste figuri, se constată și în cazul activității esterazice o creștere a stabilității α-Cht față de acțiunea inhibitoare a ionilor de Hg^{2+}, Pb^{2+} și Cu^{2+} în urma imobilizării ei. Se observă totodată, cu excepția porțiunii incipiente a curbelor de inhibiție, unde scăderea activităților esterazice ale enzimei libere este mai pronunțată, o scădere a activității practic paralelă cu creșterea cantității ionilor metalici în probă, enzima imobilizată prezentînd însă întotdeauna activități cu 10—25% mai ridicate decît cea

liberă. Activitatea esterazică a α-Cht libere scade, de pildă, la 1 μmol $HgCl_2$/probă cu 34%, condiţie în care enzima imobilizată pierde doar 8% din activitatea ei iniţială (fig. 5). La 10 μmoli $HgCl_2$ în probă, cînd enzima liberă şi-a pierdut complet activitatea esterazică, cea imobilizată mai prezintă încă 18% din activitatea ei iniţială în absenţa ionilor de Hg^{2+}.

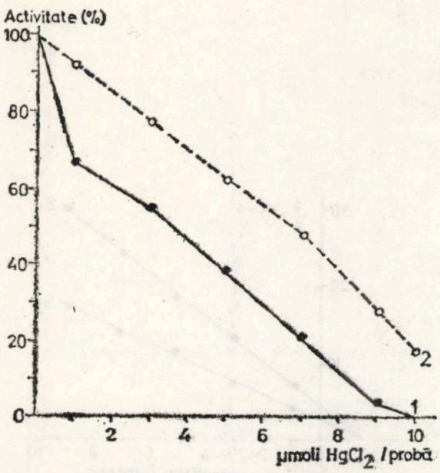


Fig. 5. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate (*2*) în funcţie de concentraţia ionilor de Hg^{2+} ($HgCl_2$).

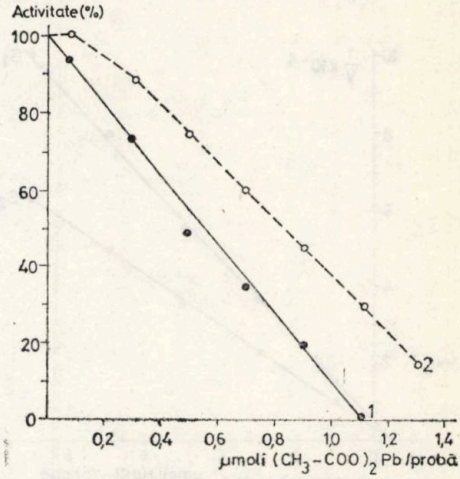


Fig. 6. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate (*2*) în funcţie de concentraţia ionilor de $Pb^{2+}((CH_3-COO)_2Pb)$.

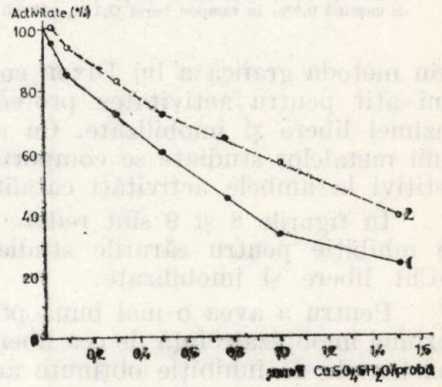


Fig. 7. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate (*2*) în funcţie de concentraţia ionilor de $Cu^{2+}(SO_4Cu \cdot 5\,H_2O)$.

Din figurile 6 şi 7 rezultă şi faptul că activitatea esterazică este mai puternic afectată de ionii de Pb^{2+} şi Cu^{2+} şi într-o măsură mai mică de cei de Hg^{2+}, iar dintre ionii de Pb^{2+} şi Cu^{2+} primii sînt cei care au acţiune inhibitoare mai puternică.

Demn de semnalat cu această ocazie este că, în timp ce ionul de Al^{3+} (fig. 4) exercită asupra activităţii proteolitice a enzimei libere şi imobilizate o inhibiţie aproape identică cu cea a ionului de Hg^{2+} (fig. 1),

în cazul activității esterazice acest ion este lipsit de orice efect, atît asupra α-Cht libere cît și asupra celei imobilizate, în concentrațiile în care s-a lucrat și cu restul ionilor studiați.

Pentru a evalua cantitativ modificările survenite în comportarea α-Cht față de ionii metalici studiați în urma imobilizării ei, am determinat

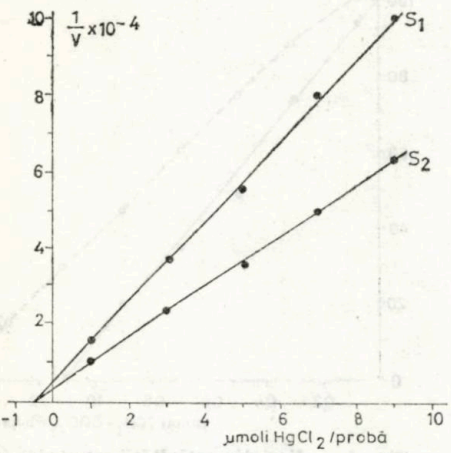


Fig. 8. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție (K_i) a $HgCl_2$ în cazul activității proteolitice a α-Cht libere.

Cele două concentrații de substrat folosite în reacție au fost: S_1 = soluție de cazeină 1,0% și S_2 = soluțle de cazeină 0,5%, în tampon borat 0,1 M, pH 8,0.

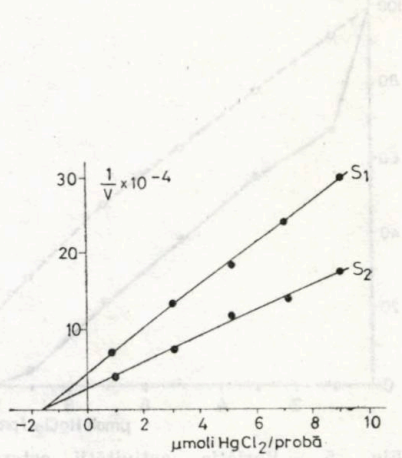


Fig. 9. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție (K_i) a $HgCl_2$ în cazul activității proteolitice a α-Cht imobilizate.

prin metoda grafică a lui Dixon constantele de inhibiție (K_i) ale acestor ioni atît pentru activitatea proteolitică, cît și pentru cea esterazică a enzimei libere și imobilizate. Cu această ocazie am putut constata că ionii metalelor studiate se comportă, fără excepție, ca inhibitori necompetitivi la ambele activități catalitice (fig. 8 și 9).

În figurile 8 și 9 sînt redate determinările grafice ale constantelor de inhibiție pentru sărurile studiate în cazul activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate.

Pentru a avea o mai bună posibilitate de comparare a comportării enzimei imobilizate față de cea liberă în prezența ionilor metalici studiați, constantele de inhibiție obținute au fost centralizate în tabela 1.

Din tabela 1 reiese clar că prin imobilizare α-Cht devine mai puțin sensibilă față de efectul inhibitor al celor patru ioni metalici, ceea ce se oglindește în creșterea valorii, uneori considerabilă, a constantei de inhibiție, care indică, după cum se știe, inversul afinității unei enzime față de un inhibitor. Cu cît valoarea K_i este mai mare, cu atît este mai mică deci afinitatea dintre enzimă și inhibitor și cu atît este mai slabă acțiunea inhibitorului asupra enzimei respective.

Creșterea valorii K_i diferă de la un ion metalic la celălalt și este maximă la ionul de Pb^{2+}, a cărui constantă de inhibiție este la enzima

imobilizată aproape de șase ori mai mare față de cea liberă. O creștere mai puțin pronunțată a valorii K_i, dar încă considerabilă, se constată și în cazul ionului Hg^{2+}, unde valoarea K_i crește prin imobilizarea enzimei de trei ori, de la 2,5 la enzima liberă la 7,5 la enzima imobilizată. Creșteri mai mici ale valorilor K_i se observă în cazul ionilor Cu^{2+} și Al^{3+}, unde aceste creșteri nu depășesc 44—46%, în comparație cu valorile găsite pentru enzima liberă.

Tabela 1

Constantele de inhibiție (K_i) ale unor ioni metalici în cazul activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht imobilizate pe agaroză activată cu BrCN, în comparație cu α-Cht liberă

Preparatul enzimatic folosit	$HgCl_2$ (K_i)		$(CH_3-COO)_2Pb$ (K_i)		$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (K_i)		$AlCl_3$ (K_i)	
	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M
α-Cht liberă	0,5	2,5	1,4	7,0	1,4	7,0	4,8	24,0
α-Cht imobilizată	1,5	7,5	8,0	40,0	2,0	10,0	7,0	35,0

În mod similar am procedat și la determinarea constantelor de inhibiție ale celor patru ioni metalici studiați în cazul activității esterazice a α-Cht libere și imobilizate (fig. 10 și 11).

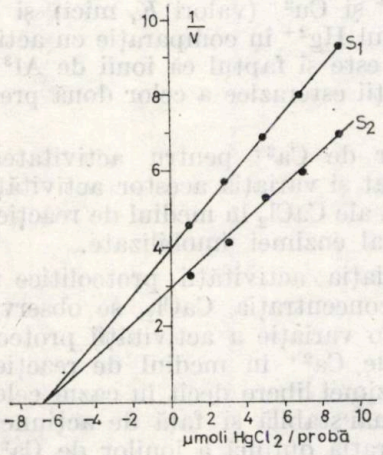


Fig. 10. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție (K_i) a $HgCl_2$ pentru activitatea esterazică a α-Cht libere.

Cele două concentrații de substrat folosite în reacție au fost de 0,66 mM BTEE (S_1) și 0,33 mM BTEE (S_2), realizate în soluție tampon Tris-HCl 0,08 M, pH 7,8.

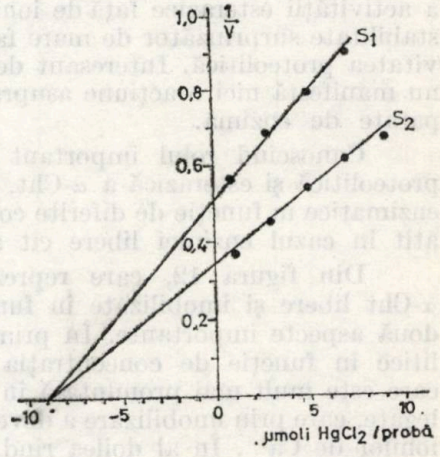


Fig. 11. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție (K_i) a $HgCl_2$ pentru activitatea esterazică a α-Cht imobilizate.

Valorile constantelor de inhibiție obținute sînt centralizate în tabela 2.

Rezultatele înscrise în tabela 2 sînt întrucîtva diferite de cele din tabela 1. Astfel, nu se mai constată creșteri atît de pronunțate ale valorilor

Tabela 2

Constantele de inhibiție (K_i) ale unor ioni metalici în cazul activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht imobilizate pe agaroză activată cu BrCN, în comparație cu α-Cht liberă

Preparatul enzimatic folosit	$HgCl_2$ (K_i)		$(CH_3-COO)_2Pb$ (K_i)		$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (K_i)		$AlCl_3$ (K_i)	
	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M	μmoli/probă	$\times 10^{-4}$M
α-Cht liberă	6,6	2,2	0,58	1,9	0,98	3,3	0	0
α-Cht imobilizată	9,0	3,0	0,98	3,3	1,3	4,3	0	0

K_i în urma imobilizării enzimei ca cele observate în cazul activității proteolitice. Aceste creșteri ale valorilor K_i reprezintă doar 30—36% la ionii de Cu^{2+}, respectiv Hg^{2+}, și ating maximul la ionii de Pb^{2+}, cu o creștere, tot relativ mică, de numai 73% în comparație cu cea observată la activitatea proteolitică a α-Cht imobilizate (57%). Înseamnă că prin imobilizare activitatea esterazică nu este protejată în aceeași măsură față de acțiunea inhibitoare a cationilor studiați, așa cum se întîmplă în cazul activității proteolitice. Se constată totodată o sensibilitate mai mare a activității esterazice față de ionii de Pb^{2+} și Cu^{2+} (valori K_i mici) și o stabilitate surprinzător de mare față de ionul Hg^{2+} în comparație cu activitatea proteolitică. Interesant de amintit este și faptul că ionii de Al^{3+} nu manifestă nici o acțiune asupra activității esterazice a celor două preparate de enzimă.

Cunoscînd rolul important al ionilor de Ca^{2+} pentru activitatea proteolitică și esterazică a α-Cht, am studiat și variația acestor activități enzimatice în funcție de diferite concentrații ale $CaCl_2$ în mediul de reacție, atît în cazul enzimei libere cît și în cel al enzimei imobilizate.

Din figura 12, care reprezintă variația activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate în funcție de concentrația $CaCl_2$, se observă două aspecte importante. În primul rînd, o variație a activității proteolitice în funcție de concentrația ionilor de Ca^{2+} în mediul de reacție, care este mult mai pronunțată în cazul enzimei libere decît în cazul celei legate, care prin imobilizare a devenit deci mai stabilă și față de acțiunea ionilor de Ca^{2+}. În al doilea rînd, concentrația optimă a ionilor de Ca^{2+} este situată pentru ambele preparate de enzimă la o cantitate de 5 mmoli $CaCl_2$/probă (ceea ce corespunde la o concentrație de 2,5 M). Aceasta este de fapt și cantitatea care se folosește de regulă în metodele clasice de determinare a activității proteolitice a α-Cht. Depășind această concentrație optimă, activitatea enzimei libere scade brusc și atinge la 12,5 mmoli $CaCl_2$ în probă o activitate de numai 15% din cea optimă. Enzima

imobilizată prezintă în aceste condiții o scădere mult mai puțin pronunțată a activității proteolitice, posedînd la 12,5 mmoli $CaCl_2$/probă încă 75% din activitatea ei optimă.

În figura 13 se prezintă variația activității proteolitice în funcție de concentrația α-Cht libere, în absența și în prezența de 5 mmoli $CaCl_2$/probă.

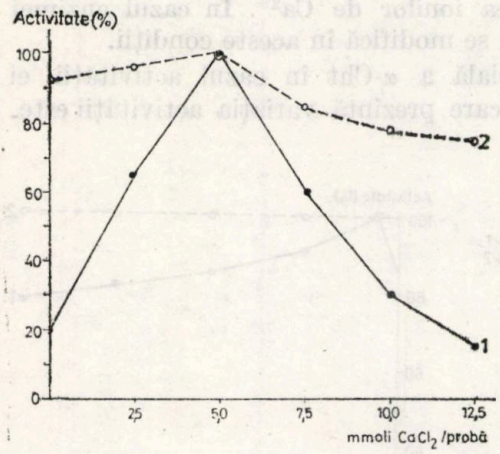


Fig. 12. — Variația activității proteolitice a α-Cht libere (*1*) și imobilizate (2) în funcție de concentrația ionilor de Ca^{2+}($CaCl_2$).

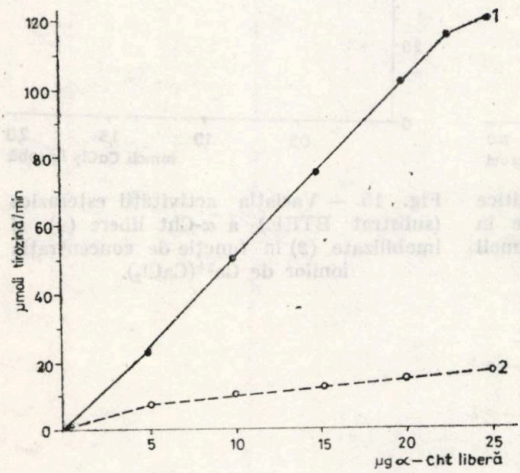


Fig. 13. — Variația activității proteolitice în funcție de cantitatea de α-Cht liberă în mediul de reacție, în absența (*1*) și în prezența (*2*) de 5 mmoli $CaCl_2$/probă.

Din această figură rezultă, pe de o parte, efectul favorabil al ionilor de Ca^{2+} asupra activității proteolitice a enzimei libere și, pe de altă parte, sensibilitatea marcantă a enzimei față de acest ion. În schimb, enzima imobilizată (fig. 14) prezintă în aceste condiții o dependență mult mai redusă a activității ei proteolitice de prezența sau de absența ionilor de Ca^{2+}. Cele două curbe de activitate ale enzimei imobilizate în prezența și în absența ionilor de Ca^{2+} au o alură practic identică, activitatea proteolitică în prezența ionilor de Ca^{2+} fiind doar foarte puțin crescută în comparație cu cea obținută în absența acestor ioni.

În figura 15 se prezintă variația activității esterazice a α-Cht libere și imobilizate în funcție de concentrația ionilor de Ca^{2+} în mediul de reacție. Și de data aceasta se constată, în comparație cu activitatea proteolitică, o comportare puțin mai deosebită. Astfel, se observă că activitatea esterazică optimă se situează la o concentrație de 0,1 mmoli $CaCl_2$ în probă ($3{,}3 \cdot 10^{-2}$ M) și că această activitate scade foarte puțin la enzima liberă odată cu creșterea ionilor de Ca^{2+}. În cazul enzimei imobilizate, activitatea esterazică nu se modifică în aceste condiții.

Această comportare mai specială a α-Cht în cazul activității ei esterazice rezultă și din figura 16, care prezintă variația activității este-

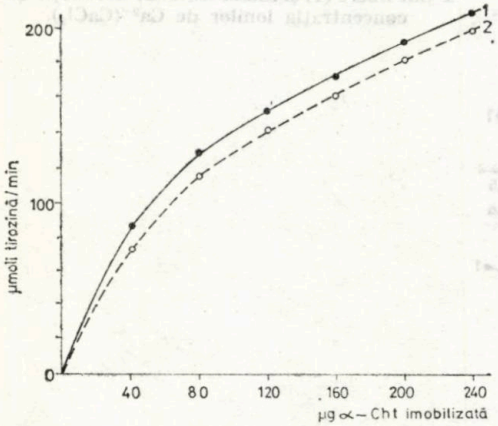


Fig. 14. — Variația activității proteolitice în funcție de cantitatea α-Cht imobilizate în absența (*1*) și în prezența (*2*) de 5 mmoli $CaCl_2$/probă.

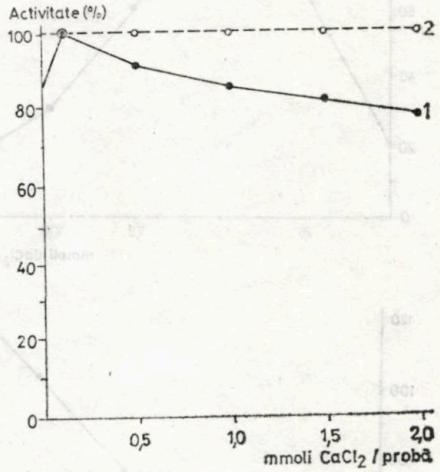


Fig. 15. — Variația activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (*1*) și imobilizate (*2*) în funcție de concentrația ionilor de Ca^{2+}($CaCl_2$).

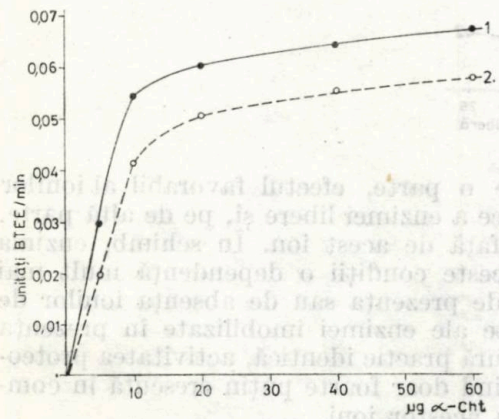


Fig. 16. — Variația activității esterazice în funcție de concentrația α-Cht libere din mediul de reacție, în absența (*1*) și în prezența (*2*) a 0,1 mmoli $CaCl_2$/probă.

razice în funcție de concentrația enzimei libere, în absența și în prezența concentrației optime de 0,1 mmoli $CaCl_2$/probă. Aliura celor două curbe obținute amintește pe cea a enzimei imobilizate în cazul activității proteolitice. Acest fapt indică o sensibilitate mai puțin pronunțată a α-Cht libere față de ionii de Ca^{2+} în cazul activității ei esterazice, în comparație cu cea proteolitică. La enzima imobilizată, cele două curbe se suprapun, motiv pentru care s-a renunțat la prezentarea grafică a datelor experimentale obținute.

CONCLUZII

1. Prin imobilizarea α-Cht pe Sepharose 4 B activată cu BrCN se obține un preparat enzimatic insolubil cu un conținut proteic de 0,8 mg/ml gel, cu o activitate proteolitică reziduală de 42% și o activitate esterazică reziduală de 72%.

2. În urma imobilizării, activitatea proteolitică a α-Cht este mult mai puțin afectată de acțiunea inhibitoare a ionilor de Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} și Al^{3+} decît cea a enzimei libere, ceea ce se oglindește și în creșterea valorilor constantelor de inhibiție ale acestor cationi.

3. Creșterea stabilității activității esterazice a α-Cht în urma imobilizării este mai puțin pronunțată față de cationii studiați în comparație cu activitatea proteolitică.

4. Comportarea α-Cht imobilizate variază în funcție atît de cationul studiat, cît și de activitatea catalitică urmărită. Astfel, în timp ce în cazul activității proteolitice valoarea K_i a acetatului de plumb crește aproape de șase ori în urma imobilizării, iar cea a $AlCl_3$ numai cu 46%, în cazul activității esterazice creșterea valorii K_i la acetatul de plumb este doar de 73%, iar $AlCl_3$ este complet lipsit de o acțiune de inhibare în concentrațiile folosite în prezenta lucrare.

5. În cazul studierii influenței diferitelor concentrații ale ionului de Ca^{2+} asupra activității proteolitice și esterazice a α-Cht libere și imobilizate, se constată, de asemenea, la enzima imobilizată o stabilitate mai mare față de variația concentrațiilor acestui ion. Ca și în cazul cationilor de Hg^{2+}, Pb^{2+} și Cu^{2+}, activitatea esterazică este mai puțin influențată de variația concentrațiilor ionilor de Ca^{2+}, atît la enzima liberă cît și la cea imobilizată, în comparație cu cea proteolitică.

Prezentat la redacție
la 24 aprilie 1980

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de enzimologie și biostimulatori,
București, Splaiul Independenței nr. 296

UNTERSUCHUNG DER EINWIRKUNG EINIGER METALLIONEN AUF DIE KATALYTISCHEN EIGENSCHAFTEN DES FREIEN UND DES AN BrCN-AKTIVIERTE SEPHAROSE 4 B GEBUNDENEN α-CHYMOTRYPSINS

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Ergebnisse dargelegt, die bei der Untersuchung der Einwirkung von Hg^{2+}-, Pb^{2+}-, Cu^{2+}-, Al^{3+}- und Ca^{2+}-Ionen auf die proteolytische und Esteraseaktivität des an Sepharose 4 B kovalent

gebundenen α-Chymotrypsins beobachtet wurden. Das trägerfixierte Enzympräparat wies einen Enzymgehalt von 0,8 mg α-Chymotrypsin/mg Gel, eine proteolytische Restaktivität von 42% und eine Esteraserestaktivität von 73% auf.

Durch Bindung an den unlöslichen Träger vergrössert sich die Beständigkeit des α-Chymotrypsins gegenüber den untersuchten Metallionen, sowohl im Falle der proteolytischen, als auch im Falle der Esteraseaktivität. Gleichzeitig konnte auch festgestellt werden, dass die Stabilität gegenüber der hemmenden Einwirkung der untersuchten Metallionen im Falle der proteolytischen Aktivität ausgeprägter war, als im Falle der Esteraseaktivität. So vergrösserte sich der K_i-Wert nach Bindung des α-Chymotrypsins an den unlöslichen Träger im Falle der proteolytischen Aktivität zwischen dreimal (Hg^{2+}) bis sechsmal (Pb^{2+}) und höchstens nur um 73% (Pb^{2+}) im Falle der Esteraseaktivität.

Die beim trägerfixierten α-Chymotrypsin eingetretenen Änderungen in seinem Verhalten gegenüber den untersuchten Metallionen hängt sowohl von den einzelnen Ionen, als auch von der Art der untersuchten katalytischen Aktivität ab.

BIBLIOGRAFIE

1. R. P. CHAMBERS, G. A. SWAN, E. M. WALLE, W. COHEN, W. H. BARICOS, *Removal of heavy metal enzyme inhibitors*, în *Immobilized enzyme technology. Research and applications*, sub red. H. H. WEETALL şi S. SUZUKI, Plenum Press, New York — London, 1975, p. 199.
2. F. R. GURD, P. E. WILCOX, Advanc. Protein Chem., **11**, 372 (1956).
3. B. L. VALLEE, J. E. COLEMAN, în *Comprehensive biochemistry*, sub red. M. FLORKIN şi E. H. STOTZ, Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 165.
4. L. J. WEBB, *Enzymes and metabolic inhibitors*, Academic Press, NewYork — London, 1966, vol. II, p. 729.
5. F. G. LOOTIENS, K. WALLENFELS, R. WEIL, Eur. J. Biochem., **14**, 138 (1970).
6. H. D. SCHELL, O. GOZIA, I. CORNOIU, M. A. MATEESCU, T. BENŢIA, Rev. roum. Biochim., **14**, 295 (1977).
7. O. GOZIA, H. D. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **16**, 273 (1979).
8. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, K. H. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **17**, 77 (1980).
9. H. D. SCHELL, D. BĂNĂŢEANU, T. BENŢIA, Rev. roum. Biochim., **17**, 137 (1980).
10. H. D. SCHELL, I. CORNOIU, St. cerc. biochim., **23**, 183 (1980).
11. G. G. GUILBAUT, *Enzyme electrodes and solid surface fluorescence methods*, în *Methods in enzymology*, sub red. S. P. COLOWICK şi N. O. KAPLAN, Academic Press, New York — San Francisco — London, 1976, vol. 44, p. 615.
12. H. D. SCHELL, A. WAHEED, D. BĂNĂŢEANU, M. RABEGA, T. BENŢIA, St. cerc. biochim., **24**, 97 (1981).
13. R. AXÉN, J. PORATH, Nature, **210**, 367 (1966).
14. M. KUNITZ, J. gen. Physiol., **30**, 291 (1947), în *Methods in enzymology*, sub red. S. P. COLOWICK şi N. O. KAPLAN, Academic Press, Inc., New York, 1955, vol. II, p. 19.
15. G. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. biophys. Acta, **16**, 570 (1955).
16. P. C. W. HUMMEL, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
17. M. L. GREEN, G. CRUTCHFIELD, Biochem. J., **115**, 183 (1969).
18. J. PORATH, R. AXÉN, S. ERNBACK, Nature, **215**, 1491 (1967).
19. A. BAR-ELI, E. KATCHALSKI, Nature, **188**, 856 (1960).

REACŢIA IMUNOGLOBULINEI G CU SUBSTANŢE DIN CLASA FLAVONOIDELOR

N. ŞT. CHIŞIU, DOINA ONICĂ, O. MAIOR, SILVIA MIHĂESCU

Prin extracţia apoasă a unor materiale de origine vegetală s-au obţinut amestecuri brute de substanţe, eterogene atît din punctul de vedere al dimensiunilor moleculare cît şi al sarcinii electrice, denumite substanţe Ch şi care au proprietatea de a precipita prin electroimunodifuzie în gel sau electroforeză în rachetă imunoglobulina G (IgG) umană şi animală. Substanţele Ch sînt foarte răspîndite în regnul vegetal, fiind aproape ubicuitare. Principiile active din substanţele Ch responsabile pentru precipitarea IgG au la bază structura flavanului (2-fenilbenzopirona), fiind o grupă mare de compuşi polihidroxilici ce cuprind materiile tanante flavonoidice, precum şi oligomerii, dimerii şi monomerii din care acestea provin prin biosinteză. Analiza raporturilor structură-funcţie (precipitarea IgG) a arătat că flavonoidele pot reacţiona cu diferite proteine plasmatice, dar că efectul de precipitare este caracteristic numai pentru IgG şi că depinde de o structură *strict specifică* a flavonoidelor. Precipitarea IgG umană din serul sanguin prin electroforeză în rachetă în geluri ce conţin substanţe Ch sau monomerii lor a permis evidenţierea unor zone multiple de precipitare, a căror intensitate şi număr variază în funcţie de serul analizat (normal sau patologic). Eterogenitatea IgG detectabilă cu ajutorul substanţelor Ch ar putea reflecta eterogenitatea izoelectrică a populaţiei de molecule de IgG normale şi patologice.

N. Şt. Chişiu (1) a obţinut prin extracţia apoasă a unor materiale de origine vegetală amestecuri brute de substanţe de culoare brun-roşcată, pe care le-a denumit substanţe Ch şi care au proprietatea de a precipita prin electroimunodifuzie în gel sau electroforeză în rachetă imunoglobulina G din serul sanguin uman şi al multor vertebrate.

Scopul acestei lucrări a fost, pe de o parte, de a studia compoziţia chimică a substanţelor Ch în vederea identificării principiilor active care sînt responsabile pentru precipitarea în gel a IgG şi, pe de altă parte, de a examina specificitatea reacţiei dintre substanţele Ch şi IgG, cu atît mai mult cu cît N. Şt. Chişiu (1) a observat că substanţele Ch *nu* precipită IgG prin imunodifuzie dacă aceasta este amestecată cu alte proteine serice.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea substanţelor Ch. Substanţele Ch au fost obţinute din făină de sîmburi de strugure, conform brevetelor (1). Pe scurt, metoda a constat din următoarele: la 1 g făină s-au adăugat 5—20 ml tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}025-0{,}05$. După 15 min de extracţie la fierbere, reziduul s-a îndepărtat prin centrifugare şi supernatantul a fost precipitat cu etanol 50%. Precipitatul format s-a depus prin centrifugare, s-a solubilizat în tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}025-0{,}05$ şi a reprezentat substanţele Ch.

Taninuri. Au fost izolate taninuri din ceai negru (fermentat), după procedeul descris de Lazurevici şi colab. (2), şi din sîmburi de strugure, după metoda Brown şi Show (3).

Taninurile condensate au fost izolate din sîmburi de strugure, conform procedeului descris de Strumeyer şi Malin (4). Separarea substanţelor tanante s-a bazat pe proprietatea lor de a fi adsorbite pe Sephadex LH—20 în etanol 95% şi eluate ulterior cu acetonă 50%.

Flavonoide. Majoritatea flavonoidelor ne-au fost puse la dispoziţie de dr. J. B. Harborn (Universitatea Reading) şi dr. H. D. Locksley (Universitatea Salford). Arilhidroxicetonele (purpurogalina şi 4,6-dihidroxicumaran-3-ona) au fost sintetizate prin metodele uzuale.

Proteine. Imunoglobulina G (IgG) umană a fost obţinută de la Kabi (Stockholm). IgG umană a fost fixată de Sepharose 4 B cu ajutorul BrCN. IgG umane monoclonale au fost izolate, din serul unor bolnavi cu mielom, prin electroforeză preparativă pe gel de agaroză (5). Determinarea subclaselor la care aparţin IgG monoclonale s-a făcut prin hidroliză cu papaină, pepsină şi reacţie cu proteina A din stafilococul auriu (6). IgG de iepure s-a obţinut din ser prin precipitare cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe DEAE-celuloză. IgG de şoarece a fost izolată prin electroforeză preparativă pe gel de agaroză. Fragmentele Fab, $F(ab')_2$ şi Fc umane ne-au fost puse la dispoziţie de dr. V. Gheţie (Institutul „Dr. V. Babeş", Bucureşti). Fragmentele $F(ab')_2$ şi Fc au provenit de la IgG1 monoclonală, iar fragmentul Fab de la IgG normală. Hidroliza IgG s-a făcut cu papaină 1 %, după tehnica descrisă de Porter (7). Albumina serică umană (ASU) a fost obţinută de la Kabi (Stockholm), ovalbumina (OA) şi albumina serică bovină (ASB) de la Sigma (St. Louis) şi lizozimul (L) de la Merck (Darmstadt).

Insolubilizarea substanţelor Ch. S-au utilizat ca medii suport Biogel P—10 şi Sephadex G—10. La 10 g mediu suport îmbibat cu tampon fosfat salin (TFS) s-au adăugat substanţe Ch în exces. S-a lăsat în contact peste noapte la temperatura camerei şi s-a îndepărtat excesul de substanţe Ch prin spălare cu TFS. Soliditatea fixării substanţelor Ch de suporturile insolubile a fost testată prin tratarea acestora cu diferiţi agenţi de desprindere: acid acetic 0,15 M, acid clorhidric 0,15 M, uree 6 M şi guanidină 6 M.

Gelfiltrare. Substanţele Ch au fost cromatografiate pe coloană de Sephadex G—100, calibrată în prealabil cu proteine de greutate moleculară cunoscută: ASU, OA şi L. Alternativ, substanţele Ch au fost analizate pe Sephadex G—10 şi G—25.

Ultrafiltrare. Substanţele Ch au fost separate în fracţiuni cu greutăţi moleculare diferite cu ajutorul filtrelor Diaflo UM—2, PM—10, PM—30 şi XM—100 (Amicon, Lexington).

Reacţia de precipitare dintre IgG umană şi substanţele Ch. La cîte 1,4 ml soluţie de IgG umană conţinînd cantităţi variabile de proteină (0,1—16 mg) s-au adăugat cîte 0,1 ml soluţie de substanţe Ch (1 mg/ml). Probele s-au incubat 2 ore la 37° C şi peste noapte la 4°C. Precipitatele formate au fost depuse prin centrifugare (10 min, 4 000 rpm), spălate de două ori cu volume constante de TFS rece, dizolvate în cîte 2 ml NaOH 1N şi citite la 280 nm. S-a reprezentat grafic variaţia absorbţiei la 280 nm în funcţie de cantitatea de IgG prezentă în amestec. În mod similar s-a procedat cînd peste concentraţii crescătoare de substanţe Ch s-a adăugat o cantitate fixă de IgG.

Inhibarea reacţiei de precipitare dintre IgG umană şi substanţele Ch. La cîte 0,6 ml soluţie Fab, $F(ab')_2$ şi Fc conţinînd cantităţi variabile de proteină (1—6 mg) s-a adăugat cîte 0,1 ml soluţie de substanţe Ch (1 mg/ml). Probele s-au incubat 2 ore la 37°C şi peste noapte la 4°C, după care s-au adăugat cîte 80 µl IgG (10 mg/ml). Amestecurile s-au incubat 2 ore la 37°C şi peste noapte la 4°C. Precipitatele formate au fost depuse prin centrifugare (10 min, 4 000 rpm), spălate de două ori cu TFS rece, dizolvate în cîte 2 ml NaOH 1N şi citite la 280 nm. S-a reprezentat grafic variaţia procentului de IgG precipitată în prezenţa inhibitorului faţă de IgG precipitată fără inhibitor în funcţie de concentraţia inhibitorului.

Interacţiunea dintre proteinele serice şi flavonoide. La 0,4 ml ASU (15 mg/ml) s-a adăugat 1 ml catechină (7 mg/ml). Amestecul s-a incubat o oră la temperatura camerei şi apoi s-a cromatografiat pe Sephadex G—25. Au fost incubaţi 0,3 ml IgG umană (15 mg/ml) cu 0,75 ml catechină (7 mg/ml) o oră la temperatura camerei. Precipitatul format a fost îndepărtat prin centrifugare (10 min, 4 000 rpm), iar supernatantul a fost cromatografiat pe Sephadex G—25. Soluţiile de proteină şi catechină au fost făcute în tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}05$. 1 ml ser sanguin uman a fost incubat cu quercetină în exces o oră la temperatura camerei şi apoi cromatografiat pe Sephadex G—200.

Electroimunodifuzia (EID). S-a folosit gelul de agar 1,3 % în tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}016$. Durata de migrare a fost de 2 ore, la o intensitate a curentului de 1 mA/cm.

Electroforeza în rachetă. S-a folosit tehnica Laurell (8) în gel de agar 1,3%, în tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}016$ ce conținea 25—50 μg/ml substanțe Ch. Durata de migrare a fost de 2 ore, la o intensitate a curentului de 1 mA/cm.

Focalizarea izoelectrică. S-a folosit gel de poliacrilamidă 6% în amfolit 2%, pH 3—10 și uree 6 M (9).

REZULTATE

Caracterizarea substanțelor Ch

Eterogenitatea dimensiunilor moleculare. Gelfiltrarea pe o coloană de Sephadex G-100 a permis separarea substanțelor Ch în trei fracțiuni, insuficient delimitate, care au prezentat piscuri în trei zone de masă moleculară, și anume 120 000 daltoni (pisc I), 10 000 daltoni (pisc II) și 6 000 daltoni (pisc III). Aspectul piscurilor sugerează că fiecare dintre aceste fracțiuni este, la rîndul ei, eterogenă (fig. 1).

Aceste rezultate au fost verificate prin ultrafiltrare fracționată. S-au obținut cinci fracțiuni cu mase moleculare distincte, și anume 2 000 daltoni (fr. 1), 2 000—10 000 daltoni (fr. 2), 10 000—30 000 daltoni (fr. 3), 30 000—100 000 daltoni (fr. 4) și >100 000 daltoni (fr. 5). Fracțiunile obținute au prezentat omogenitate satisfăcătoare, așa cum rezultă din analiza prin gelfiltrare pe Sephadex G-10 a fracțiunii 3, în care peste 95% din material a fost omogen cromatografic, impuritățile cu masă moleculară mai mică fiind sub 5% (fig. 2). În ciuda omogenității sale aparente, piscul I (fig. 2) a fost fracționat și mai avansat prin gelfiltrare

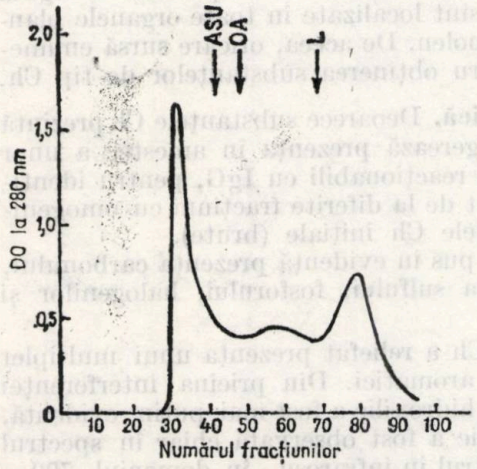


Fig. 1. — Gelfiltrarea substanțelor Ch pe coloană de Sephadex G—100 (106×1,9 cm) în tampon Tris — HCl 0,1M, pH 8,0 ce conține NaCl 0,2 M. Săgețile indică volumele de eluție ale proteinelor folosite la calibrarea coloanei: albumină serică umană (ASU), ovalbumină (OA) și lizozim (L).

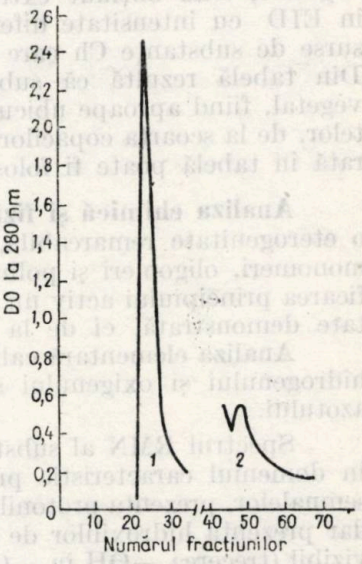


Fig. 2. — Gelfiltrarea substanțelor Ch cu greutate moleculară cuprinsă între 10 000 și 30 000 daltoni pe o coloană de Sephadex G—10 (78×2 cm) în tampon fosfat salin, pH 7,4. Densitatea optică a fracțiunilor din piscul I s-a măsurat în cuva cu drum optic de 0,2 cm, iar cea din piscul II în cuva de 1 cm.

pe Sephadex G—25 în doi produși, unul cu masă moleculară de aproximativ 30 000 daltoni și celălalt în jur de 10 000 daltoni. Toți produșii Ch obținuți, cu excepția fracțiunii 1 (2 000 daltoni), au reacționat în EID cu IgG umană.

Eterogenitatea izoelectrică. Substanțele Ch analizate prin focalizare izoelectrică în gel de poliacrilamidă au prezentat 15 benzi, plasate spre capătul anodic al plăcii.

Afinitatea față de IgG. Substanțele Ch s-au fixat în proporție de 75% prin trecere pe o coloană de IgG umană cuplată de Sepharose 4B. Într-o proporție similară s-a fixat și fracțiunea 3, obținută prin ultrafiltrare fracționată. Fracțiunea nereținută de coloana de IgG-Sepharose 4 B a pierdut capacitatea de a reacționa cu IgG umană în EID. Substanțele Ch fixate de coloană au fost desorbite, în două etape, cu dodecilsulfat de sodiu 1%, urmat de uree 10 M. Fracțiunile eluate au prezentat o eterogenitate similară cu cea a produsului inițial.

Identificarea principiului activ din substanțele Ch

Determinarea surselor naturale. Aplicînd o tehnică de extracție identică cu cea descrisă pentru obținerea substanțelor Ch din semințe de strugure (vezi „Material și metode") asupra unor variate materiale vegetale, s-au obținut extracte capabile să reacționeze cu IgG umană în EID cu intensitate diferită. În tabela 1 sînt prezentate principalele surse de substanțe Ch care au furnizat extracte ce au precipitat cu IgG. Din tabelă rezultă că substanțele Ch sînt foarte răspîndite în regnul vegetal, fiind aproape ubicuitare, și sînt localizate în toate organele plantelor, de la scoarța copacilor pînă la polen. De aceea, oricare sursă enumerată în tabelă poate fi folosită pentru obținerea substanțelor de tip Ch.

Analiza chimică și fizico-chimică. Deoarece substanțele Ch prezintă o eterogenitate remarcabilă, care sugerează prezența în amestec a unor monomeri, oligomeri și polimeri, toți reacționabili cu IgG, pentru identificarea principiului activ nu s-a pornit de la diferite fracțiuni cu omogenitate demonstrată, ci de la substanțele Ch inițiale (brute).

Analiza elementară calitativă a pus în evidență prezența carbonului, hidrogenului și oxigenului și absența sulfului, fosforului, halogenilor și azotului.

Spectrul RMN al substanțelor Ch a reliefat prezența unui multiplet în domeniul caracteristic protonilor aromatici. Din pricina interferenței semnalelor, prezența protonilor de tip hidroxilic a fost mai puțin evidentă, dar prezența hidroxililor de tip fenolic a fost observată chiar în spectrul vizibil (trecerea —OH în $-O^{\ominus}$). Spectrul în infraroșu, în domeniul 700—3 800 cm^{-1}, a indicat prezența unor substanțe polimere care au grupări hidroxilice asociate și maxime ce au fost atribuite unor legături de tip C—O—C și C—O în moleculă. S-a confirmat, de asemenea, prezența nucleului aromatic și, posibil, a unor legături C=O.

Prin teste specifice au fost excluse următoarele substanțe: aminoacizi, peptide, proteine, steroizi, aldohexoze, cetohexoze (legături glicozidice ale substanțelor Ch cu diverși hidrați de carbon) și alcaloizi.

Analiza chimică și spectrală a substanțelor Ch a extins cîmpul de investiție spre clasele de compuși naturali de origine vegetală ce conțin grupări fenolice și care pot forma totodată oligomeri și polimeri. Ținînd seama de proprietățile fizice și chimice ale substanțelor Ch, ca și de condițiile lor de preparare, s-a avansat ipoteza că substanțele Ch sînt compuși

Tabela 1

Principalele surse de substanțe Ch din regnul vegetal

Familia	Genul	Sursa	Reacția cu IgG umană
GIMNOSPERMAE			
Taxaceae	*Taxus* (tisă)	coajă	+
Pinaceae	*Abies* (*brad*)	coajă, conuri	+
	Picea (molid)	coajă, conuri	+
	Juniperus (ienupăr)	coajă, conuri	+
ANGIOSPERMAE			
Corylaceae	*Corylus* (alun)	coajă	3+
Betulaceae	*Betula* (mesteacăn)	coajă	3+
Fagaceae	*Fagus* (fag)	scoarță	3+
	Quercus (stejar)	scoarță, gale	4+
Juglandaceae	*Juglans* (nuc)	coajă fruct verde	3+
Polygonaceae	*Rumex* (măcriș)	frunze, rădăcină	2+
Tamaricaceae	*Tamarix* (cătină)	fruct	2+
Rosaceae	*Malus* (măr)	scoarță, frunze	2+
	Cerasus (cireș)	scoarță, codița fructului	3+
*Leguminosae**	*Lens* (linte)	sămînță	2+
Tiliaceae	*Tilia* (tei)	floare	2+
Vitaceae	*Vitis*** (viță de vie)	sîmbure	3+
Hypericaceae	*Hypericum* (sunătoare)	floare	+
*Liliaceae****	*Allium* (ceapă)	foile uscate ale bulbului	3+

* Nici una din celelalte specii nu conține substanțe Ch.

** Substanțele Ch sînt prezente în vinul roșu.

*** În *Gramineae* nu s-au identificat substanțe Ch.

\+ reacție slabă; 2 + reacție netă; 3 + reacție intensă; 4 + reacție foarte intensă.

din clasa flavonoidelor (materii tanante flavonoidice). Pentru a verifica această ipoteză s-au făcut experiențe de izolare a materiilor tanante flavonoidice din surse vegetale prin tehnici acreditate în literatura de specialitate (vezi „Material și metode"). S-au obținut astfel materii tanante flavonoidice din ceai negru (fermentat) (2) și sîmburi de strugure (3) și s-a constatat că ele reacționează cu IgG umană prin EID la fel ca substanțele Ch. Aceste experiențe au dovedit apartenența substanțelor Ch la clasa materiilor tanante flavonoidice. Pentru a examina dacăre activitatea materiilor tanante flavonoidice cu structură polimerică este o proprietate a macromoleculei sau este o însușire intrinsecă a monomerilor din

Tabela 2

Reacția substanțelor flavonoide cu IgG umană (testare prin electroimunodifuzie)

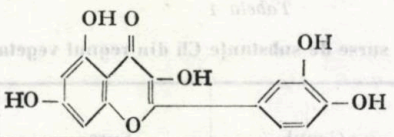
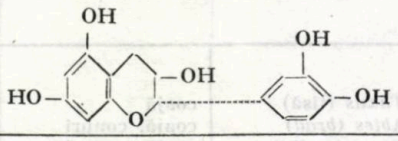
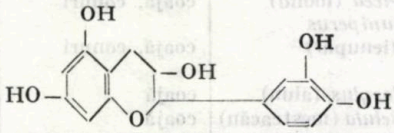
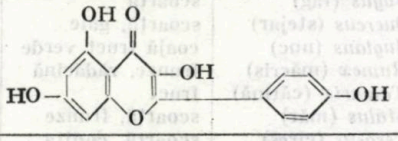
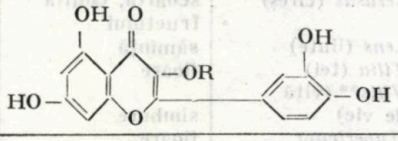
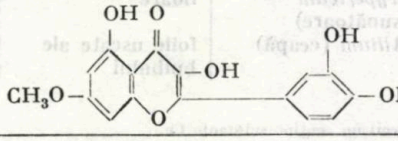
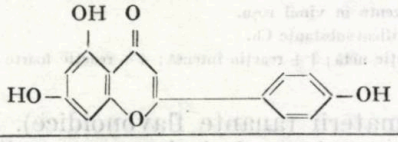
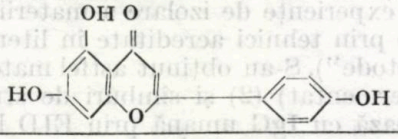
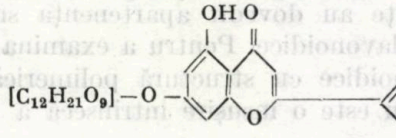
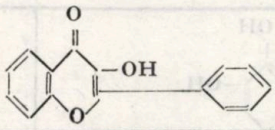
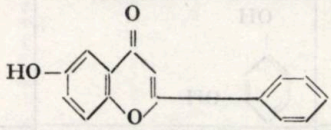
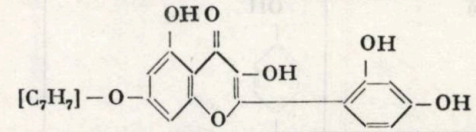
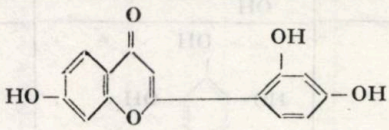
Produsul	Structura chimică	Reacția cu IgG
Quercetină		3+
Catechină		3+
Epicatechină		3+
Kampferol		2+
Rutină	 R = rutinoză	—
Ramnetină		—
Apigenină		—
Narigenină		—
Hesperidină		—

Tabela 2 (continuare)

Produsul	Structura chimică	Reacția cu IgG
3-Hidroxiflavonă		—
6-Hidroxiflavonă		—
7-O-Benzoilquercetină		—
2′, 4′, 7-Trihidroxiflavonă		—

3 + reacție intensă; 2 + reacție netă; + reacție slabă; — negativ.

care acestea provin (catechina și epicatechina), s-au testat atît monomerii corespunzători, cît și un număr mare de flavonoide naturale și de sinteză, cu o structură înrudită, precum și un număr de polifenoli și arilhidroxicetone. S-a constatat că multe din substanțele flavonoidice au fost capabile să precipite IgG umană în EID, ca și substanțele Ch sau materiile tanante flavonoidice extrase din ceai și din semințe de strugure (tabela 2), spre deosebire de polifenoli și arilhidroxicetone, care nu au reacționat cu IgG (tabela 3). Rezultatele obținute au dovedit că principiile active din substanțele Ch au la bază structura flavanului (2-fenilbenzopironă) (fig. 3)

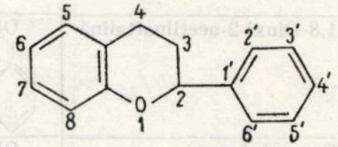


Fig. 3. — Structura flavanului.

și sînt o grupă mare de compuși polihidroxilici ce cuprind materiile tanante flavonoidice, precum și oligomerii, dimerii și monomerii din care acestea provin prin biosinteză.

Tabela 3

Reacţia polifenolilor şi a arilhidroxicetonelor cu IgG umană (testare prin electroimunodifuzie)

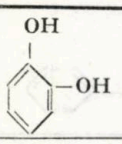
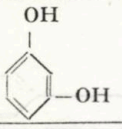
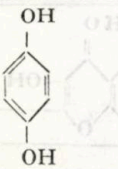
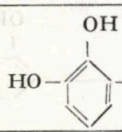
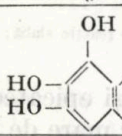
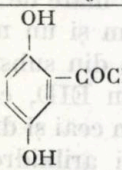
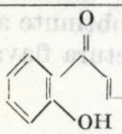
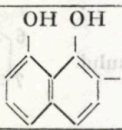
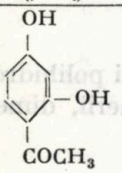
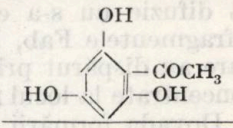
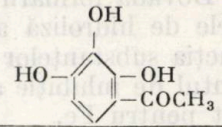
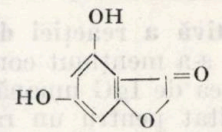
Produsul	Structura chimică	Reacţia cu IgG
Pirocatechină		—
Rezorcină		—
Hidrochinonă		—
Pirogalol		—
Purpurogalină		—
2,5-Dihidroxiacetofenonă		—
2-Hidroxibenzilidenaceto-fenonă		—
1,8-Dioxi-2-acetilnaftalină		—
Rezacetofenonă		—

Tabela 3 (continuare)

Produsul	Structura chimică	Reacția cu IgG
Floracetofenonă		—
Galacetofenonă		—
4,6-Dihidroxicumaran-3-onă		—

Reacția substanțelor Ch și a derivaților lor cu IgG

Electroimunodifuzia și electroforeza în rachetă. Imunoglobulinele G izolate din ser normal de om, iepure și șoarece au prezentat 1—2 linii de precipitare cu substanțele Ch în EID (fig. 4, *A*). Aceeași imagine a fost obținută dacă în locul IgG purificate s-a folosit serul ca atare (fig. 4, *B*). Electroforeza în rachetă în gel de agar ce conține substanțe Ch a evidențiat 3—4 zone de precipitare pentru IgG provenite de la diferite specii, atît cînd s-a analizat serul ca atare cît și IgG purificate (fig. 4, *C* și *D*). Serurile provenite de la pacienți cu diferite afecțiuni au prezentat un număr variabil de zone de precipitare, mai mare sau mai mic decît cel manifestat de serul normal (fig. 4, *E*). Aspecte similare de electroimunodifuzie și electroforeză în rachetă s-au obținut dacă substanțele Ch au fost înlocuite cu monomerii corespunzători, de exemplu catechina, epicatechina etc. (vezi tabela 2).

Reacția dintre substanțele Ch și subclasele de IgG. Gradul de precipitabilitate al IgG monoclonale cu substanțele Ch, apreciat după cantitatea de precipitat format în tub, a fost diferit, deși reacția s-a făcut pentru un raport IgG/Ch constant (12,5/1). Dintre cele șase proteine testate (4 IgG1 și 2 IgG2), două proteine (1 IgG1 și 1 IgG2) nu au precipitat cu substanțele Ch.

Electroforeza în rachetă a uneia din IgG1 monoclonale este prezentată în figura 5. Aspectul înregistrat pentru IgG1 (3—4 zone de precipitare) este similar cu cel observat pentru IgG normală. Aceasta sugerează că zonele de precipitare prezentate de IgG normală nu corespund unor subclase diferite de IgG, din moment ce apar și în cazul unei IgG monoclonale.

Reacția dintre substanțele Ch și fragmentele de hidroliză ale IgG. Intensitatea liniei de precipitare dintre IgG umană hidrolizată cu papaină 1% și substanțele Ch a scăzut pe măsură ce timpul de hidroliză a fost

mai mare, fiind practic absentă după o oră de reacţie. Aceasta a sugerat că substanţele Ch formează complexe solubile cu fragmentele Fab şi Fc, eliberate din IgG prin hidroliză, supoziţie verificată prin reacţia directă dintre substanţele Ch şi fragmentele Fab, $F(ab')_2$ şi Fc izolate din IgG sau IgG1. Dacă prin dublă difuzie nu s-a evidenţiat nici un fel de reacţie între substanţele Ch şi fragmentele Fab, $F(ab')_2$ şi Fc, în EID au apărut linii de culoare maro, care au dispărut prin spălare şi care reprezintă probabil substanţele Ch concentrate la locul reacţiei cu fragmentele sub forma unor complexe solubile. Dovada formării complexelor solubile între substanţele Ch şi fragmentele de hidroliză ale IgG o constituie capacitatea acestora de a inhiba reacţia substanţelor Ch cu IgG (fig. 6). Pentru concentraţii similare, procentul de inhibiţie a fost mai mare pentru fragmentele Fab şi $F(ab')_2$ decît pentru Fc.

Măsurarea cantitativă a reacţiei de precipitare dintre substanţele Ch şi IgG umană. Dacă s-a menţinut constantă concentraţia substanţelor Ch şi s-a variat cantitatea de IgG umană adăugată, s-a obţinut o cantitate maximă de precipitat pentru un raport mediu în greutate de 8/1 între IgG şi substanţele Ch (fig. 7). Pentru acest raport de amestecare, corespunzător zonei de echivalenţă, precipitatul a conţinut 60—80% din IgG adăugată. Supernatantul corespunzător zonei de echivalenţă a rămas colorat, ceea ce a dovedit prezenţa substanţelor Ch fie sub formă liberă, fie sub forma unor complexe solubile cu IgG. Prezenţa complexelor solubile ar explica şi faptul că în precipitat nu s-a găsit întreaga cantitate de IgG adăugată în mediu.

Dacă s-a menţinut constantă concentraţia de IgG şi s-a variat concentraţia substanţelor Ch, s-au obţinut cantităţi din ce în ce mai mari de precipitat, pe măsură ce concentraţia substanţelor Ch a crescut.

Aceste rezultate au arătat că precipitatele IgG — substanţe Ch sînt solubile în exces de IgG şi insolubile în exces de substanţe Ch. Mai mult, în exces de substanţe Ch, s-a constatat o creştere continuă a cantităţii de precipitat, format probabil prin supraadăugarea treptată a substanţelor Ch peste precipitatul care a epuizat cantitatea de IgG existentă iniţial în mediul de reacţie.

Specificitatea reacţiei dintre substanţele Ch şi IgG

Deoarece este bine cunoscut că materiile tanante sînt capabile să precipite unele proteine (de ex. gelatina, proteine din lapte, proteine din piele etc.) (10)—(12), s-au efectuat experienţe care au urmărit să determine dacă precipitarea IgG este rezultatul unei interacţiuni specifice cu substanţele Ch şi monomerii lor sau dacă este provocată de deshidratarea moleculei proteice printr-un efect similar cu cel al salifierii. În acest scop s-au efectuat cromatografii de excludere moleculară, pe geluri de Sephadex, a unor amestecuri de albumină, IgG sau ser sanguin cu catechină sau quercetină, în exces de flavonoid. Analiza distribuţiei proteinelor şi flavonoidelor în profilul cromatografic este prezentată în tabelele 4 şi 5. Rezultatele arată că flavonoidele s-au legat nu numai de IgG, ci şi de albumină (tabela 4) şi celelalte proteine plasmatice distribuite în piscul I (masă

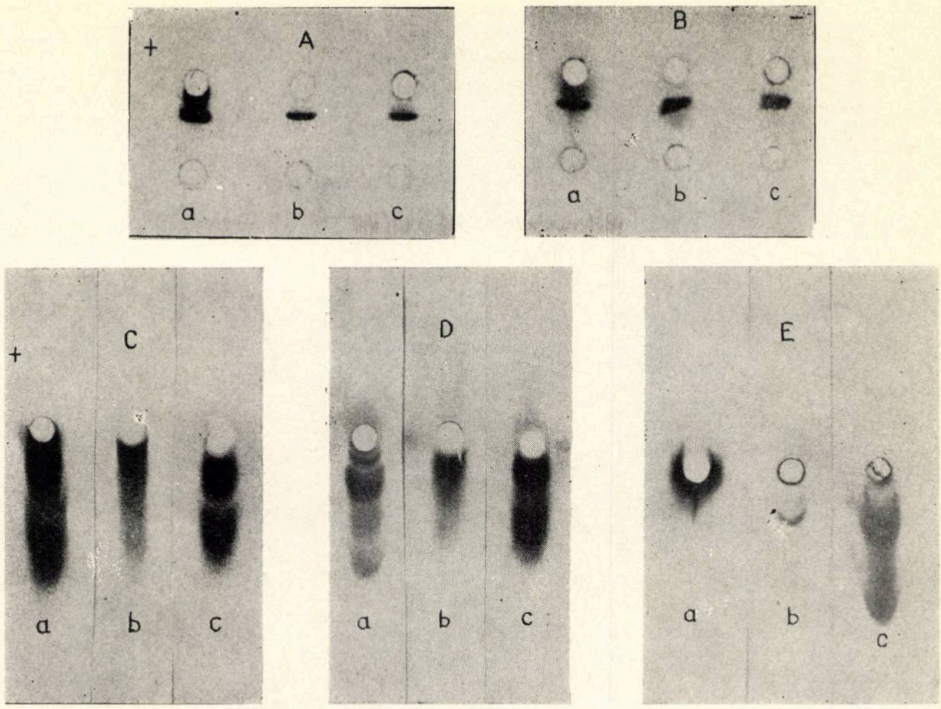


Fig. 4. — *A*, Electroimunodifuzia IgG de om (*a*), iepure (*b*) și șoarece (*c*) față de substanțele Ch. *B*, Electroimunodifuzia serului normal de om (*a*), iepure (*b*) și șoarece (*c*) față de substanțele Ch. *C*, Electroforeza în rachetă a IgG de om (*a*), iepure (*b*) și șoarece (*c*) în gel de agar 1, 3% ce conține 50 μg/ml substanțe Ch. *D*, Electroforeza în rachetă a serului normal de om (*a*), iepure (*b*) și șoarece (c) în gel de agar 1,3% ce conține 50 μg/ml substanțe Ch. *E*, Electroforeza în rachetă a serurilor provenite de la pacienți cu diferite afecțiuni (*a*, *b*, *c*) în gel de agar 1,3% ce conține 25—50 μg/ml substanțe Ch.

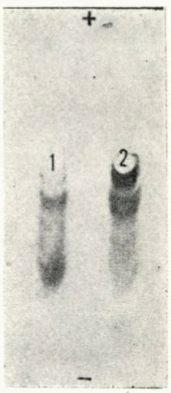


Fig. 5. — Electroforeza în rachetă a IgG1 (*1*) și IgG normale (*2*) în gel de agar 1,3% ce conține 25 μg/ml substanțe Ch.

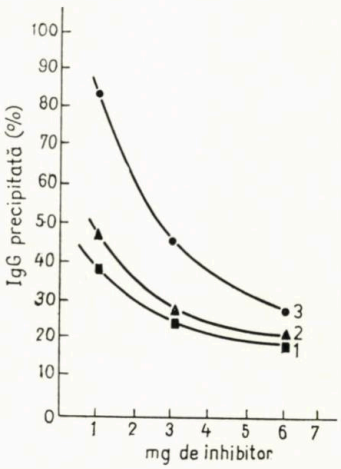


Fig. 6. — Inhibarea reacției de precipitare dintre substanțele Ch și IgG umană de către fragmentele Fab(*1*), $F(ab')_2$ (*2*) și Fc (*3*).

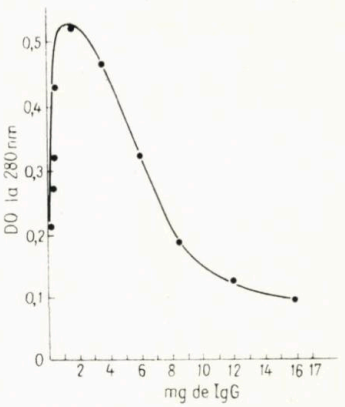


Fig. 7. — Curba de precipitare dintre substanțele Ch și IgG pentru o concentrație constantă de substanțe Ch.

moleculară de aproximativ 10^6 daltoni) și piscul III (masă moleculară de aproximativ 5×10^4 daltoni) (tabela 5).

Aceste rezultate arată că substanțele Ch (materiile tanante flavonoidice), ca și monomerii lor, sînt capabile să reacționeze nu numai cu IgG,

Tabela 4

Analiza distribuției catechinei și a unor proteine serice în piscurile cromatografice obținute prin gelfiltrarea amestecurilor pe Sephadex G—25

Produsul analizat	Distribuția în profilul cromatografic	
	pisc I	pisc II
Albumină serică umană	+	—
IgG umană	+	—
Catechină	—	+
Amestec albumină serică umană cu catechină	+ +	— +
Amestec IgG umană* cu catechină	+ +	— +

* Majoritatea IgG precipită la adăugarea catechinei. La cromatografie s-a aplicat supernatantul rămas după îndepărtarea precipitatului prin centrifugare.
+ = prezență; — = absență.

dar și cu alte proteine plasmatice, ceea ce demonstrează că reacția de combinare dintre IgG și substanțele Ch și derivații lor *nu* este specifică. Pe de altă parte, substanțele Ch și derivații lor au capacitatea de a precipita net, dintre toate proteinele plasmatice testate de noi, numai IgG, ceea ce sugerează că reacția de precipitare discriminează între IgG și celelalte proteine plasmatice, dar numai în condițiile în care ele nu se găsesc în amestec (ca în serul sanguin).

Tabela 5

Analiza distribuției quercetinei și a proteinelor din serul sanguin uman în piscurile cromatografice obținute prin gelfiltrarea amestecului pe Sephadex G—200

Produsul analizat	Distribuția în profilul cromatografic			
	pisc I	pisc II	pisc III	pisc IV
Ser sanguin uman (tipuri principale de proteină)	IgM	IgG	albumină	—
Quercetină	—	—	—	+
Amestec ser sanguin uman cu quercetină	IgM +	IgG +	albumină +	— +

+ = prezență; — = absență.

Capacitatea substanțelor Ch de a interacționa cu proteinele serice după imobilizare pe suporturi solide

Substanțele Ch au reacționat cu geluri bogate în grupări amidice sau hidroxilice, ca Biogel P-10 (pe bază de poliacrilamidă) și Sephadex G-10 (pe bază de dextran), fără nici o activare prealabilă a gelurilor. Cantitatea de substanțe Ch fixate pe Sephadex și soliditatea legăturii

Tabela 6

Desprinderea substanțelor Ch fixate de geluri suport

Agentul de desprindere	Procent de desprindere de pe:	
	Biogel P—10	Sephadex G—10
Tampon fosfat salin (pH 7,4, 0,15 M)	0	0
Acid acetic 0,15 M	0	0
Acid clorhidric 0,15 M	0	0
Uree 6 M	sub 10%	sub 10%
Guanidină 6 M	sub 10%	sub 10%

formate au fost considerabile, așa cum rezultă din procentul mic de desprindere sub acțiunea unor agenți care rup legături saline sau de hidrogen (tabela 6). Contrar așteptărilor, coloane de Biogel P-10 și Sephadex G-10 cu substanțele Ch fixate nu au fost capabile să rețină IgG sau proteine din serul sanguin, ceea ce dovedește că substanțele Ch s-au legat de aceste suporturi, amidice sau hidroxilice, cu aceleași grupări active cu care se leagă și de IgG. Deoarece acești derivați insolubilizați ai substanțelor Ch nu sînt capabili să mai fixeze proteine, ei sînt inutilizabili ca imunosorbenți.

DISCUȚII

Rezultatele obținute au dovedit că substanțele Ch izolate din diverse surse vegetale sînt un amestec eterogen, în care predomină materiile tanante flavonoidice, responsabile pentru precipitarea IgG umană și animală prin electroimunodifuzie și electroforeză în rachetă. În funcție de procedeul de extracție aplicat și de sursa vegetală utilizată, se obțin substanțe Ch a căror compoziție în oligomeri și polimeri variază considerabil. De aceea este de preferat ca, în locul unui extract brut care conține o cantitate variabilă de materii tanante flavonoidice, aflate într-o stare de polimerizare de asemenea supusă variației, să se utilizeze numai monomerii lor (catechina, epicatechina, leucoantocianidinele), respectiv quercetina, care pot fi obținuți din surse naturale sau prin sinteză și care au proprietatea de a precipita IgG în electroimunodifuzie la fel ca substanțele Ch.

Analiza raporturilor structură — funcție (precipitarea IgG) pentru substanțele prezentate în tabela 2 a condus la concluzia că structura generală a substanțelor care pot produce precipitarea IgG este cea a grupei

polihidroxiflavanului. Confruntînd structura substanțelor utilizate cu capacitatea lor de a reacționa cu IgG, rezultă că pentru o reacție pozitivă produsul flavanic, respectiv flavonic, trebuie să aibă o structură bine determinată, și anume *trebuie* să conțină grupările hidroxil libere în poziția C_3 și C_7 și *nu* apare necesară gruparea oxo din C_4 și nici dubla legătură dintre C_2 și C_3. Drept exemplu care să sprijine această afirmație putem lua perechea quercetină/rutină sau quercetină/ramnetină. Astfel, rutina nu reacționează cu IgG, în timp ce quercetina, obținută prin hidroliza rutinei cu acid sulfuric 8% și care se deosebește de aceasta numai prin faptul că gruparea oxidril din poziția C_3 este liberă, dă reacție intens pozitivă. De asemenea, ramnetina, care, spre deosebire de quercetină, are gruparea oxidril din poziția C_7 blocată, nu reacționează cu IgG. Dacă pentru a exercita efectul de precipitare se cere, așadar, reprezentanților din grupa flavonoidelor o structură *strict specifică*, nu același lucru se poate spune despre specificitatea reacției lor cu IgG. Experiențele noastre au dovedit că cel puțin doi dintre reprezentanții flavonoidelor (catechina și quercetina) sînt capabili să se lege nu numai de IgG, ci și de albumina serică umană, ca și de alte proteine din serul sanguin uman (tabelele 4 și 5). Această constatare este întărită de imposibilitatea de a precipita IgG din serul sanguin în prezența celorlalte proteine serice. Astfel, substanțele Ch și derivații lor nu dau reacție de precipitare cu IgG prin imunodifuzie (1). Se impune, așadar, concluzia că ceea ce este *specific* pentru substanțele Ch și monomerii lor nu este legarea de anumite grupări caracteristice ale moleculei de IgG, ci doar capacitatea lor de a insolubiliza molecula de care s-au legat. Acest lucru a reieșit clar la analiza reacției dintre substanțele Ch și fragmentele de IgG. S-a observat că reacția cu substanțele Ch nu poate fi localizată selectiv în unul din fragmentele de hidroliză, așa cum ar fi fost de așteptat în cazul unei reacții specifice cu o grupare determinată din molecula de IgG. Dimpotrivă, s-a constatat că toate fragmentele au reacționat cu Ch, dar că nici unul din ele nu a mai precipitat. Această ultimă comportare sugerează că pentru insolubilizare sub acțiunea substanțelor Ch este necesar ca molecula de IgG să fie intactă.

Precipitarea IgG umană din serul sanguin prin electroforeză în rachetă în geluri care conțin substanțe Ch sau monomerii lor prezintă o particularitate distinctivă, și anume apariția unor zone multiple de precipitare în regiunea catodică a migrării. Această eterogenitate a IgG umane nu a putut fi pusă în legătură cu prezența celor patru subclase deoarece proteine mielomatoase aparținînd unei singure subclase (de ex. IgG1) au prezentat o eterogenitate similară cu cea a IgG normale. Analiza la întîmplare a unui mare număr de seruri umane normale și patologice a arătat că în serurile patologice se înregistrează abateri notabile de la aspectul normal atît în ceea ce privește numărul fracțiunilor, cît și mobilitatea lor electroforetică și procentul cantitativ. Deși nu s-a putut stabili pînă în prezent o corelație între natura unor afecțiuni și perturbarea calitativă a reacției dintre IgG și substanțele Ch încorporate în gel, se poate totuși afirma că eterogenitatea IgG, evidențiată cu substanțele Ch, nu este un artefact metodologic. Este astfel cunoscut că IgG din serul normal este alcătuită dintr-o populație eterogenă de molecule care reflectă activitatea policlonală a limfocitelor B și a descendenților lor. Această eterogenitate poate fi evidențiată prin focalizare izoelectrică, prin care se arată că

există cel puțin 10—12 categorii de IgG umane cu puncte izoelectrice distincte (13). Ținînd seama de aceste date, putem presupune că eterogenitatea evidențiată prin reacția dintre substanțele Ch și IgG are aceeași origine ca și cea izoelectrică, cu deosebirea că electroforeza are o rezoluție mai redusă și astfel numărul speciilor moleculare, bine delimitate una de cealaltă, este mai mic (aproximativ 4 benzi). Dacă moleculele de IgG pot lega cantități diferite de substanțe Ch în funcție de punctele lor izoelectrice, atunci mobilitatea lor electroforetică, în testul cu substanțe Ch, va reflecta punctul izoelectric. Eterogenitatea evidențiată prin testul de electroforeză în rachetă cu substanțe Ch sau unul din monomerii lor (de ex. catechină) poate reflecta, așadar, eterogenitatea izoelectrică a populației de molecule de IgG normale și patologice. Aplicarea acestui test nu necesită izolarea IgG din ser (ca în cazul focalizării izoelectrice) și ar putea surprinde modificări ale distribuției IgG în grupele izoelectrice în cazuri patologice.

Mulțumiri. Această lucrare a fost suportată financiar prin contracte cu Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie, pe anii 1976—1978. Autorii sînt recunoscători profesorului I. Moraru (Institutul „Dr. V. Babeș") pentru sprijinul și interesul manifestat, profesorului I. Mânzatu (Institutul de fizică și inginerie nucleară) pentru sprijin și discuții folositoare și dr. V. Gheție (Institutul „Dr. V. Babeș") pentru indicațiile date pe parcursul lucrării și pentru generozitatea cu care ne-a furnizat multe materiale întrebuințate în lucrare. De asemenea, mulțumim Marianei Caralicea pentru excelenta asistență tehnică.

Prezentat la redacție
la 1 noiembrie 1980

Institutul „Dr. Victor Babeș", București
și
Institutul Politehnic, București,
Catedra de chimie organică

INTERACTION OF HUMAN IgG WITH FLAVONOIDS

SUMMARY

Crude products, denoted as Ch substances, were obtained by aqueous extraction of some plant material. These substances were heterogeneous by molecular weight and electric charge and were able to precipitate human and animal immunoglobulin G (IgG) during electroimmunodiffusion or rocket electrophoresis. The Ch substances are apparently ubiquitously distributed in plants. The active components of the Ch substances responsible for IgG precipitation were shown to be flavan derivatives, namely polyhydroxylic compounds comprising both condensed tannins and the corresponding oligomers and monomers. The analysis of the structure-function (IgG precipitation) relationship has shown that the flavonoids react with different plasma proteins but do precipitate IgG only, the precipitation being dependent on a certain structure of the flavonoid. Rocket electrophoresis of human serum in gel containing Ch substances or their corresponding monomers evinced discrete precipitation areas for IgG. These areas were different in intensity and number depending on the type of tested serum (normal or pathologic). The heterogeneity of IgG detected by using Ch substances could reflect the isoelectric heterogeneity of IgG molecules found in normal and pathologic sera.

BIBLIOGRAFIE

1. Brevete OSIM· 59682/1975; 59683/1975; 59684/1975; 59685/1975; 59686/1975; 59687/1975.
2. G. V. LAZUREVICI, S. V. TERENTEVA, A. A. SAMSURIN, *Prakticeskie rabotî po himii prirodnîh soedinenii*, Izd. Vîșșaia Skola, Moscova, 1966, p. 248.
3. B. R. BROWN, M. R. SHOW, J. chem. Soc. (C), 2036 (1974).
4. D. H. STRUMEYER, M. J. MALIN, J. agric. Food chem., **23**, 909 (1975).
5. D. MOȚET, V. GHEȚIE, Rev. roum. Biochim., **1**, 175 (1964).
6. D. R. STANWORTH, M. W. TURNER, în *Handbook of experimental immunology*, ed. D. M. WEIR, Blackwell Scientific Publ., Oxford—London — Edinburgh — Melbourne, 1973, vol. I, cap. 10.
7. R. R. PORTER, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
8. C. B. LAURELL, Analyt. Biochem., **15**, 45 (1966).
9. C. WRIGLEY, Science Tools, **15**, 17 (1968).
10. E. HASLAM, *Chemistry of vegetable tannins*, Academic Press, London, 1966.
11. J. B. HARBORN, T. J. MARBRY, H. MARBRY, în *The flavonoids*, ed. CHAPMAN and Hall, Londra, 1975.
12. K. FREUDENBERG, K. WEINGES, în *Progress in the chemistry of organic natural products*, ed. L. ZECHMEISTER, Springer-Verlag, Viena, **16**, 1, 1958.
13. Z. L. AWDEH, A. R. WILLIAMSON, B. A. ASKONAS, Biochem. J., **116**, 241 (1970).

STUDIUL ELECTROFORETIC ÎN FUNCŢIE DE VÎRSTĂ AL PROTEINELOR MITOCONDRIALE DIN FICATUL DE ŞOBOLAN

SIMONA COFARU, CORNELIA RUSU

Rezumat. Proteinele fracţiunii mitocondriale din ficatul de şobolan tînăr, adult şi bătrîn au fost analizate prin electroforeza în gel de poliacrilamidă-dodecilsulfat de sodiu. Nu s-au constatat modificări în modelele de migrare odată cu înaintarea în vîrstă. Electroforegramele conţin 22 de componenţi polipeptidici cu greutăţile moleculare între 10 000 şi 140 000.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă nu indică o corelaţie între vîrstă şi greutăţile moleculare ale lanţurilor polipeptidice din mitocondriile de ficat de şobolan. Această tehnică nu permite informaţii cu privire la asociaţiile oligomere existente în proteinele mitocondriale *in situ*, asociaţii native care probabil ar fi responsabile de implicarea mitocondriilor în procesul de îmbătrînire.

Fenomenele îmbătrînirii la nivel celular sînt elucidate prin studii de structură şi funcţie celulară, dependente de vîrstă.

Proteinele sînt implicate în îmbătrînire deoarece, odată cu înaintarea în vîrstă, apar modificări funcţionale care sînt dependente de enzime.

Rezultatele unor studii anterioare efectuate pe fracţiuni mitocondriale au relevat legătura dintre modificările ce apar în structura şi funcţiile mitocondriilor, pe de o parte, şi procesul de îmbătrînire, pe de altă parte.

Descreşterea fosforilării oxidative folosind ca substrat β-hidroxibutirat (1), scăderea semnificativă a activităţii oxidative (2), (3), creşterea fragilităţii mitocondriale (1), (4) a diferitelor fracţiuni mitocondriale la animale bătrîne susţin implicarea mitocondriei în îmbătrînire ca un fenomen general.

Avînd în vedere observaţiile semnalate, ne-am propus să studiem eventualele modificări ce apar în subfracţiunile proteice mitocondriale din ficatul de şobolan la diferite vîrste.

Pentru a înlătura problemele de fracţionare şi proteoliză, selective cu vîrsta, am lucrat cu probele proteice complet solubilizate utilizînd electroforeza pe geluri cilindrice de poliacrilamidă în prezenţa dodecilsulfatului de sodiu (SDS), tehnică cu o rezoluţie înaltă şi o sensibilitate mai mare decît metodele folosite în studiile anterioare pentru compararea proteinelor la animalele tinere şi bătrîne. Această tehnică s-a utilizat pentru diferite studii pe mitocondrii : compoziţia proteică a membranelor mitocondriale (5), (6), (7), (8), a componenţilor de membrană izolaţi (complexele lanţului respirator (9), citocromoxidaza (10), (11), ATP-aza (12)), locul de acţiune al inhibitorilor şi decuplanţilor (13), (14).

MATERIALE ŞI METODE

Prepararea fracţiunii mitocondriale. S-a lucrat pe cîte zece şobolani, femele, rasa Wistar, de următoarele vîrste: tineri 2—3 luni, adulţi 6—8 luni, bătrîni 22—24 luni.

Mitocondriile din ficatul de şobolan au fost izolate după metoda Schneider şi Hageboom (15). Sedimentul final a fost suspendat în tamponul de electroforeză la o concentraţie proteică de 10—20 mg/ml, proteina mitocondrială fiind determinată, după metoda Hartree (16), cu albumină serică bovină ca standard.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă-dodecilsulfat de sodiu. Am urmat tehnica lui Shapiro şi colab. (17), (18), clasică pentru determinarea greutăţilor moleculare prin electroforeză în gel de poliacrilamidă—SDS, recunoscută valabilă pentru un număr mare de proteine (19), (20). S-au folosit în paralel două sisteme de electroforeză modificate de noi, în scopul standardizării metodei de lucru.

Unul din sisteme conţine tamponul de electroforeză, format din 0,02 M acetat de sodiu, 0,04 M Tris, 0,002 M acid etilendiamintetraacetic (EDTA), 0,2% SDS la pH 7,4. Soluţia pentru formarea gelurilor conţine 6% acrilamidă, 0,16% bisacrilamidă, 0,05% N, N, N′—tetrametilendiamină (TEMED), 0,1% persulfat de amoniu în tamponul de electroforeză.

Al doilea sistem (21) este alcătuit din tamponul de electroforeză: 0,025 M tampon fosfat de sodiu, 0,01 M EDTA, 0,2% SDS la pH 7,2, şi din soluţia gelurilor: 7,5% acrilamidă, 0,2% bisacrilamidă, 0,05% TEMED, 0,1% persulfat de sodiu, în tamponul de electroforeză.

În continuare, metoda de lucru a fost aceeaşi pentru cele două sisteme.

Prepararea gelurilor. Soluţia gelurilor a fost turnată în tuburi (5 × 150 mm) şi acoperită cu un strat de apă. După polimerizare, s-a înlocuit apa cu tamponul de electroforeză, iar gelurile au fost preparate cu 24 de ore înainte de migrare.

Pregătirea probelor proteice pentru electroforeză. Proteinele de referinţă utilizate în vederea determinărilor de greutăţi moleculare (β-galactozidază 130 000, albumină serică bovină 68 000, ovalbumină 43 000, tripsină 23 000, citocrom C 11 700), precum şi proteinele mitocondriale au fost tratate 1 minut la 100°C cu amestec denaturant, care conţine 1% SDS, 1% 2-mercaptoetanol, 5% glicerină în concentraţii finale. S-au introdus pe geluri 5—10 μg proteină de referinţă şi 100—150 μg proteină mitocondrială într-un volum de 25 μl. Pentru calibrarea gelurilor, probele s-au colorat cu un colorant trasor: albastru de bromfenol.

Electroforeza s-a efectuat cu un curent de 1 mA/gel pînă cînd probele au intrat în gel şi apoi intensitatea curentului s-a mărit la 8 mA/gel pînă cînd albastrul de bromfenol a ajuns la aproximativ 1,5 cm de capătul inferior al gelului.

După electroforeză, gelurile au fost scoase din tuburi; au fost măsurate lungimea gelului şi distanţa de migrare a colorantului trasor.

La fixarea fracţiunilor proteice s-a utilizat o soluţie 25% (V/V) izopropanol şi 10% (V/V) acid acetic glacial (22), specifică pentru cazurile în care este prezent SDS în gelul şi în tamponul de migrare.

Colorarea probelor. Gelurile s-au introdus 4—6 ore în 0,02% Coomasie brillant blue R 250, proaspăt diluat în 12,5% acid tricloracetic (23). Soluţia coloidală de colorant se leagă selectiv de fracţiunile proteice, restul gelului colorîndu-se foarte slab.

Decolorarea fondului gelurilor s-a făcut cu 10% acid tricloracetic; apoi, gelurile s-au păstrat în apă.

S-a măsurat lungimea gelului după colorare, precum şi distanţa de migrare a fracţiunilor proteice. Deoarece în timpul colorării şi al decolorării gelurile se umflă, calculul mobilităţii include lungimea gelului înainte şi după colorare, ca şi distanţa de migrare a fracţiunilor proteice şi a colorantului trasor (19):

$$\text{mobilitatea} = \frac{\text{distanţa de migrare a proteinelor}}{\text{lungimea gelului după colorare}} \times \frac{\text{lungimea gelului înainte de colorare}}{\text{distanţa de migrare a colorantului trasor}}$$

S-a prezentat grafic logaritmul greutăţilor moleculare ale proteinelor de referinţă în funcţie de mobilităţile lor şi s-a obţinut o dreaptă ce reprezintă curba semilogaritmică etalon a sistemului de geluri.

REZULTATE

Metodele de migrare obținute după electroforeza cantităților egale de proteină mitocondrială din ficatul de șobolan tînăr, adult și bătrîn au fost comparate vizual pe baza intensității benzilor aflate la aceeași distanță de migrare.

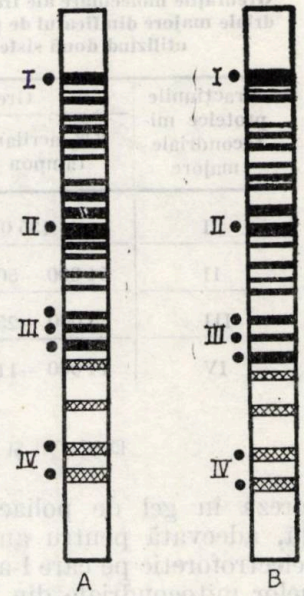


Fig. 1. — Electroforegramele ce indică modelul identic de migrare a subfracțiunilor proteice mitocondriale din ficatul de șobolan tînăr, adult și bătrîn în două sisteme de electroforeză în gel de poliacrilamidă — SDS: *A*, geluri conținînd 6% acrilamidă, tampon tris 0,04 M, pH 7,4; *B*, geluri conținînd 7,5% acrilamidă, tampon fosfat 0,025 M, pH 7,2.

Fracționarea proteinelor mitocondriale, obținută în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă utilizînd ambele sisteme de electroforeză (fig. 1), confirmă rezultatele găsite de Melnick și colab. (6).

Pentru electroforeza în gel de poliacrilamidă—SDS a mitocondriilor din ficatul de șobolan tînăr, adult sau bătrîn, utilizînd geluri 6% acrilamidă, tampon tris 0,04 M, pH 7,4, se obține un model de migrare identic, reprezentat de figura 1, *A*.

Nici al doilea sistem de electroforeză folosit (geluri 7,5% acrilamidă, tampon fosfat 0,025 M, pH 7,2) nu indică diferențe în modelul de migrare în funcție de vîrstă (fig. 1, *B*).

Electroforegramele *A* și *B* relevă 22 de fracțiuni proteice, repartizate într-un model complex de migrare, reproductibil.

Au fost evidențiate patru fracțiuni proteice majore, notate, după Melnick și colab. (6), cu numere romane: I, II, III, IV, și cu puncte (fig. 1). Lățimea benzilor indică intensitatea relativă de colorare, iar benzile slab colorate sînt reprezentate prin porțiuni haşurate.

Diferențele foarte mici care apar în dispunerea benzilor între cele două sisteme de electroforeză folosite sînt neînsemnate.

Cele două sisteme de geluri au fost calibrate cu proteine de referinţă; pentru fracţiunile proteice mitocondriale majore, greutăţile moleculare sînt cuprinse între 10 000 şi 140 000 (tabela 1).

Diferenţele de greutăţi moleculare dintre cele două sisteme sînt mici şi pot fi considerate în limita de sensibilitate a metodei (10%).

Tabela 1

Greutăţile moleculare ale fracţiunilor proteice mitocondriale majore din ficatul de şobolan tînăr, adult şi bătrîn utilizînd două sisteme de electroforeză

Fracţiunile proteice mitocondriale majore	Greutatea moleculară	
	6% acrilamidă, tampon tris	7,5% acrilamidă, tampon fosfat
I	135 000	125 000
II	54 000 — 50 000	53 000 — 49 000
III	35 000 — 25 000	32 000 — 23 000
IV	14 000 — 11 000	14 000 — 11 000

DISCUŢII ŞI CONCLUZII

Electroforeza în gel de poliacrilamidă—SDS este o metodă cu o rezoluţie înaltă, adecvată pentru analizele calitative.

Studiul electroforetic pe care l-am efectuat indică o mare heterogenitate a proteinelor mitocondriale din ficatul de şobolan.

Cei 22 de componenţi polipeptidici separaţi, cu greutate moleculară între 10 000 şi 140 000, sînt repartizaţi într-un model complex de migrare, reproductibil.

Utilizînd pentru proteinele mitocondriale denaturarea şi electroforeza în prezenţa SDS, fracţiunile proteice obţinute, care apar pe geluri sub forma unor benzi, reprezintă cîte un singur lanţ polipeptidic, de o anumită greutate moleculară.

În studiul nostru nu s-a obţinut o corelaţie între vîrstă şi greutăţile moleculare ale lanţurilor polipeptidice din mitocondriile de ficat. Analiza electroforetică în geluri de poliacrilamidă—SDS a proteinelor din creierul de şobolan tînăr, adult şi bătrîn (24) are de asemenea ca rezultat o identitate a modelelor de migrare.

Toate particulele celulare există într-o stare dinamică de continuă degradare şi reînnoire.

Mitocondriile sînt organite discrete, compuse din mai multe grupări de macromolecule diferite, care trebuie să fie sintetizate şi asamblate într-o corelaţie bine stabilită pentru a obţine integritatea structurală şi funcţională.

Nivelele proteinelor mitocondriale sînt determinate de vitezele lor de sinteză şi degradare.

Sanadi și Fletcher (25) au studiat efectul vîrstei asupra „turnover"-ului mitocondriilor din ficat și nu au găsit diferențe mari.

„Turnover"-ul mitocondriilor într-o serie de țesuturi de șobolan tînăr, adult și bătrîn a fost studiat (26) și nu s-au găsit diferențe semnificative între animalele tinere și bătrîne.

Alte studii indică corelația dintre modificările care apar în structura și funcția mitocondriilor și îmbătrînire (1), (2), (3), (4).

Electroforeza în gel de poliacrilamidă—SDS nu permite informații cu privire la aranjamentul spațial al componentelor proteice în mitocondrie și la asociațiile oligomere native existente în proteinele mitocondriale *in situ*, asociații care probabil ar fi responsabile de implicarea mitocondriei în îmbătrînire.

Este foarte important să se identifice fracțiunile proteice cu funcționalitatea și proprietățile enzimatice ale mitocondriei. Un progres în acest sens îl reprezintă benzile majore obținute prin separarea pe gel a proteinelor membranelor interne mitocondriale (8), identificate cu activitățile enzimatice pe care le reprezintă.

Prezentat la redacție
la 17 septembrie 1980

Institutul Național
de
Gerontologie și Geriatrie
București, str. Mînăstirea Căldărușani nr. 9

ELECTROPHORETIC STUDY OF LIVER MITOCHONDRIAL PROTEIN FROM YOUNG, ADULT AND AGED RATS

SUMMARY

Liver mitochondrial protein from young, adult and aged rats was studied in the sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. There were no changes in the electrophoretic patterns, with increasing age. The electrophoregrams contained 22 polypeptidic components ranging between 10 000—140 000 molecular weight.

Polyacrylamide gel electrophoresis indicated no correlation between age and molecular weights of the polypeptidic chains in rat liver mitochondria. This technique affords no information concerning the oligomeric associations existing *in situ* in the mitochondrial protein. There are native associations which are probably responsible for the implication of mitochondrion in aging.

BIBLIOGRAFIE

1. E. C. WEINBACH, I. GARBUS, J. biol. Chem., **234**, 412 (1959).
2. J. C. CHEN, I. B. WARSHAW, D. R. SANADI, J. Cell Physiol., **80**, 141 (1972).
3. B. BULOS. S. SHUKLA. B. SACKTOR, Arch. Biochem. Biophys., **149**, 461 (1972).
4. A. R. INAMDAR, R. PERSON, P. KOHNEN, H. DUNDAN, B. MACKLER, J. Geront., **29**, 638 (1974).
5. C. A. SCHNAITMAN, Proc. nat. Acad. Sci., U. S. A., **63**, 412 (1969).

6. R. L. MELNICK, H. M. TINBERG, J. MAGUIRE, L. PACKER, Biochim. Biophys. Acta, **311**, 230 (1973).
7. H. M. TINBERG, R. L. MELNICK, J. MAGUIRE, L. PACKER, Biochim. Biophys. Acta, **345**, 118 (1974).
8. R. A. CAPALDI, Arch. Biochem. Biophys., **163**, 99(1974).
9. K. TAKAYAMA, D. H. MAC LEMNAM, A. TZAGOLOFF, C. D. STONER, Arch. Biochem. Biophys., **114**, 223 (1964).
10. R. A. CAPALDI, H. HAYASHI, FEBS Letters, **26**, 261 (1972).
11. T. F. CHUANG, F. L. CRANE, Biochem. Biophys. Res. Commun., **42**, 1076 (1971).
12. P. L. PEDERSEN, T. ESKA, H. P. MORRIS, W. A. CATTERAL, Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A., **68**, 1079 (1971).
13. V. DASGUPTA, J. S. RIESKE, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 1247 (1973).
14. W. G. NANSTEIN, Fed. Proc. Amer. Soc. exp. Biol., **32**, 515 (1972).
15. G. HAGEBOOM, W. SCHNEIDER, G. PALADE, J. biol. Chem., **172**, 619 (1948).
16. E. F. HARTREE, Anal. Biochem., **48**, 422 (1972).
17. A. L. SHAPIRO, E. VINUELA, J. V. MAIZEL, Biochem. Biophys. Res. Commun., **28**, 815 (1967).
18. A. L. SHAPIRO, J. V. MAIZEL, Anal. Biochem., **29**, 505 (1969).
19. K. WEBER, M. OSBORN, J. biol. Chem., **244**, 4406 (1969).
20. A. K. DUNKER, R. R. RUECKERT, J. biol. Chem., **244**, 5074 (1969).
21. J. J. SKEHEL, G. C. SCHILD, Virology, **44**, 396 (1971).
22. F. FAIRBANKS, T. L. STECK, D.F.H. WALLACH, Biochemistry, **10**, 2606 (1971).
23. A. CHRAMBACH, R. A. REISDELD, M. MYCKOFF, J. ZACCARI, Anal. Biochem., **20**, 150 (1967).
24. W. I. VANGHAN, M. CALVIN, Gerontology, **23**, 110 (1977).
25. D. R. SANADI, M. J. FLETCHER, în N. W. SHOCK, *Biological aspects of aging*, Columbia University Press, New York, 1962, p. 298.
26. R. A. MENZIES, P. H. GOLD, J. biol. Chem., **246**, 2425 (1971).

UREOGENEZA ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE, M. ŞERBAN

Rezumat. S-a cercetat activitatea ornitin-carboimil-transferazei (OCT) hepatice în diabetul aloxanic comparativ cu lotul normal.
În diabetul aloxanic, principala enzimă a ciclului urogenetic (OCT) este activată pînă la 227,4% faţă de lotul martor. Ca urmare a acestei creşteri a activităţii OCT, întregul ciclu urogenetic este activat, avînd ca rezultat o creştere a nivelului ureei sanguine şi urinare. Activarea OCT reprezintă încă un argument că teoria lui Lazarow cu privire la caracterul tiol privat al aloxanului nu are aplicabilitate generală.

Sindromul diabetic, printre multiplele sale posibilităţi de manifestare, afectează şi funcţiile metabolice ale ficatului. În contextul unor dereglări ale proceselor metabolice, devin afectate şi anumite sisteme enzimatice implicate în metabolismul proteic, tulburări asemănătoare cu cele manifestate în numeroase afecţiuni hepatice (1).

Ornitin-carboimil-transferaza (OCT) (EC 2.1.3.3) este o enzimă din ciclul ureogenezei care catalizează transferul unei grupe carboimil activate pe gruparea delta amino a ornitinei, cu formare de citrulină. La mamifere există în cantitate crescută în ficat, în cantitate mică în intestinul subţire, iar în alte organe este absentă (2).

Determinarea activităţii plasmatice a OCT este importantă în afecţiunile hepatice, fiind mult mai sensibilă decît L-aspartat aminotransferaza (EC 2.6.1.1), fosfataza alcalină (EC 3.1.3.1) sau alte enzime (3), (4), (5). Deoarece diabetul zaharat se corelează sub aspect biochimic cu unele dereglări metabolice la nivelul ficatului, în această notă ne-am propus ca obiectiv să investigăm activitatea acestei enzime organospecifice în ficatul unor şobolani cu diabet aloxanic.

În acest sens, abordarea acestui aspect ne-a fost sugerată şi de unele date obţinute anterior (6), şi anume că în diabetul aloxanic concentraţia hepatică a aminoacizilor liberi scade semnificativ, ca urmare a intensificării proceselor de gluconeogeneză şi cetogeneză hepatică pe seama aminoacizilor gluco- şi cetoformatori. La subiecţii normali, ficatul îndepărtează amoniacul din sîngele portal, ceea ce prezintă o deosebită importanţă, avîndu-se în vedere că amoniacul este toxic pentru sistemul nervos central.

În aceste condiţii şi ca efect al proceselor de catabolizare a aminoacizilor liberi, cantitatea de amoniac rezultată creşte, fapt care determină o solicitare a capacităţii de detoxifiere a ficatului pe calea ureogenezei.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe ţesutul hepatic provenit de la şobolani masculi din rasa Sprague Dowley, în vîrstă de 6—8 luni şi cu o greutate cuprinsă între 225 şi 335 g. Experienţele s-au efectuat pe două loturi: un lot normal şi un lot la care s-a produs experimental diabet aloxanic. Inducerea

diabetului aloxanic s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de aloxan de 12,5 mg/100 g corp, în soluţie tampon fosfat citrat de pH 3,5. Prin determinarea glicemiei, s-a considerat că şobolanii sînt în stare diabetică din momentul în care s-a instalat o fază de hiperglicemie permanentă, cu valori cuprinse între 450 şi 650 mg glucoză/100 ml.

Animalele au fost sacrificate prin exanghinare cardiacă, prelevîndu-se sîngele şi ficatul. Sîngele a fost recoltat pe heparină, iar din plasma obţinută prin centrifugare s-a dozat glucoza prin metoda cu orto-toluidină (7). Ficatul prelevat a fost spălat în mod repetat cu ser fiziologic la rece şi ulterior omogenizat într-un omogenizator de tip POTTER, în soluţie tampon TRIS—HCl pH 7,4. Raportul de extracţie a fost de 1 g ţesut la 3 ml soluţie tampon. Omogenatul a fost centrifugat la 5 000 × g şi la rece timp de 30 de minute. Supernatantul obţinut a fost diluat cu apă distilată în proporţie de 1/9, fiind astfel utilizat pentru dozarea activităţii enzimatice a ornitin-carboimil-transferazei. Activitatea ornitin-carboimil-transferazei a fost determinată prin metoda cu reactivul fosfoferic-antipirină (3), iar rezultatele au fost exprimate în micromoli citrulină/min/g proteină. Rezultatele au fost prelucrate statistic şi comparate prin testul Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate valorile activităţii OCT hepatice la lotul martor şi la lotul tratat cu aloxan.

Din analiza rezultatelor obţinute (fig. 1) se constată că activitatea OCT hepatică prezintă o creştere de 227,4% la lotul tratat cu aloxan comparativ cu lotul martor. Creşterea activităţii OCT poate fi corelată cu o stare funcţională distinctă a ficatului animalelor de laborator cărora li s-a indus diabet aloxanic, ca de altfel şi al bolnavilor de diabet zaharat.

Într-o lucrare anterioară (6), am arătat că arginina hepatică înregistrează o scădere de 95% la lotul aloxanizat în comparaţie cu lotul martor. Această scădere intens semnificativă este în deplină concordanţă cu observaţia că activitatea ornitin-carboimil-transferazei înregistrează o creştere de pînă la 227,4%. Astfel, creşterea activităţii OCT poate justifica

Tabela 1

Valorile activităţii OCT hepatice la lotul normal şi la cel cu diabet aloxanic

Probe	μM citrulină/min/g proteine X ± Sm
Ficat lot normal	2,37 ± 0,15
Ficat lot tratat cu aloxan	5,61 ± 0,12
Testul Student	16,25; p < 0,001
Activitate faţă de normal	(+) 227,4 %

şi creşterea ureei sanguine şi urinare, raportată la diabetici (8).

În consecinţă, se poate considera că în diabetul aloxanic, datorită faptului că gluconeogeneza din aminoacizii glucoformatori se intensifică

(6), cantitatea de amoniac crește mult peste limitele normale și, prin urmare, trebuie să crească și capacitatea de detoxifiere a ficatului, ceea ce se realizează printr-o activare a ciclului ureogenezei.

Din datele obținute rezultă astfel că ornitin-carboimil-transferaza este o enzimă a cărei activitate se intensifică în diabetul aloxanic, ca și cea a fosfatazei acide (9) și sorbitol-dehidrogenazei (10).

Această constatare, pe lîngă cele consemnate anterior (6), (8), reprezintă încă un argument experimental în sensul că teoria lui Lazarow

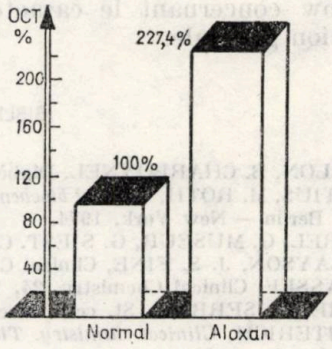


Fig. 1. — Activitatea OCT la lotul tratat cu aloxan comparativ cu lotul normal.

(11) cu privire la caracterul tiol privat al aloxanului nu are aplicabilitate generală. Se poate presupune că intensificarea activității ornitin-carboimil-transferazei hepatice se datorește și unei influențe hormonale directe, respectiv modificării raportului insulină/glucagon (9).

CONCLUZII

1. În diabetul aloxanic, activitatea ornitin-carboimil-transferazei hepatice crește pînă la 227,4%.

2. Creșterea activității OCT hepatice este în concordanță cu datele obținute anterior, și anume că arginina se regăsește într-o concentrație foarte mică în cazul diabetului aloxanic.

3. Creșterea activității OCT hepatice în diabetul aloxanic presupune o intensificare a ciclului ureogenezei, ceea ce poate justifica creșterea nivelului ureei sanguine și urinare, raportată la diabetici.

4. Activitatea OCT reprezintă încă un argument că teoria lui Lazarow cu privire la acțiunea aloxanului asupra grupărilor tiol nu are aplicabilitate generală.

Prezentat la redacție
la 20 mai 1980

Facultatea de medicină, Craiova,
Disciplina biochimie
și
Facultatea de medicină veterinară, București,
Disciplina biochimie

L'URÉOGENÈSE EN DIABÈTE ALLOXANIQUE

RÉSUMÉ

On a observé l'activité de l'ornithyl-carbamyl-transférase (EC 2.1.3.3.) hépatique des rats en diabète produit par l'administration d'alloxane. Dans le diabète alloxanique, on a constaté des changements significatifs de l'activité de l'ornithyl-carbamyl-transférase (OCT) hépatique par comparaison du lot témoin ; l'activité spécifique de l'OCT augmente de 227,4%. L'activation d'OCT prouve, une fois de plus, que la théorie du Lasarow concernant le caractère thiol privé de l'alloxane n'a pas d'application générale.

BIBLIOGRAFIE

1. J. GUILLON, B. CHARBONNEL, Diabète et metabolisme, **1**, 191 (1975).
2. H. CURTIUS, M. ROTH, *Clinical biochemistry. Principles and methods*, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1974.
3. A. BAGREL, G. MUSEUR, G. SIEST, Clinical Chemistry, **21**, *12*, 1716 (1975).
4. K. J. CLAYSON, J. S. FINE, Clinical Chemistry, **21**, *6*, 754 (1975).
5. A. A. VASSEF, Clinical Chemistry, **24**, 101 (1978).
6. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **23**, *2*, 135 (1980).
7. R. RICHTERICH, *Clinical chemistry. Theory and practice*, Academic Press, New York — London, 1969.
8. K. OBERDISSE, *Diabetes mellitus*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1977.
9. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **22**, *2*, 133 (1979).
10. V. DARIE, teză de doctorat, Bucureşti, 1979.
11. LEYDEN J. WEBB, *Enzymes and metabolic inhibitors*, vol. III, Academic Press, New York — London, 1966.

ACŢIUNEA UNOR DERIVAŢI AI ACIZILOR ORTO- ŞI METAAMINOBENZOICI ASUPRA ACTIVITĂŢII FOSFATAZEI ACIDE LA PLANTE

VALENTINA JURCA, ELVIRA TANASE

Rezumat. S-a cercetat *in vitro* şi *in vivo* acţiunea unor compuşi organici cu structură tiocarbanilido-tiosemicarbazidică, tetrahidrochinazolinică, 1,3,4-tiadiazolică şi 1,2,4-triazolică, derivaţi din acizii orto- şi metaaminobenzoici şi hidrazidele lor, asupra fosfatazei acide (E. C. 3.1.3. 2) cu optimum de pH=6,2 în cazul plantelor de cultură *(Triticum durrum)*, al plantelor ornamentale *(Pelargonium zonalae)* şi al buruienilor *(Cyrsium arvensae)*. Sensul şi intensitatea acţiunii acestor compuşi asupra enzimei variază în funcţie de structura lor chimică, de concentraţie şi de natura enzimei. Rezultatele obţinute duc la ideea că activitatea fosfatazei acide, în cazul tratării plantelor cu diverse substanţe chimice active, poate constitui un test al eficacităţii şi stabilirii caracterului de inhibitor sau de stimulator de creştere la plante.

Cercetările privind modificările chimice induse la plante de diverse substanţe cu caracter antidăunător sau regulator de creştere suscită tot mai mult atenţia, deoarece, pe de o parte, ele facilitează găsirea unor indici în selectarea produselor cu eficacitate sporită, iar pe de altă parte contribuie la explicarea modalităţilor lor de acţiune.

Pe baza acestor considerente şi a faptului că modificările enzimatice reflectă modificările metabolice ca o consecinţă a acţiunii diverselor substanţe, în lucrarea de faţă ne-am propus să cercetăm comportarea unor compuşi organici derivaţi ai acizilor orto- şi metaaminobenzoici faţă de fosfataza acidă la plante, enzimă cu implicaţii multiple în metabolismul celular. Compuşii noi sintetizaţi supuşi experimentărilor (1)—(4) s-au dovedit a fi biologic activi (5).

Avînd în vedere că eficacitatea, selectivitatea şi fitotoxicitatea substanţelor chimice cu acţiune la plante depind de structura chimică, de doza, de epoca de administrare şi de particularităţile metabolice ale speciilor de plante (6), experienţele *in vitro* şi *in vivo* s-au efectuat pe plante de cultură, pe plante ornamentale şi pe buruieni în perioade diferite de dezvoltare a acestora, utilizîndu-se concentraţii variabile de substanţe.

MATERIAL ŞI METODE

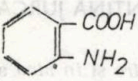
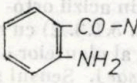
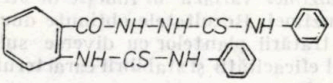
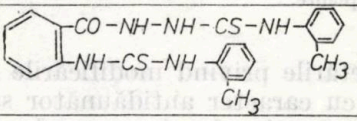
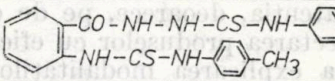
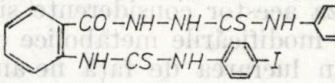
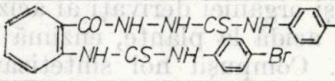
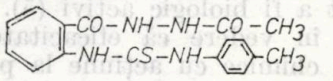
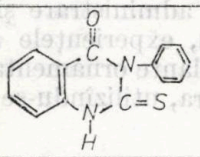
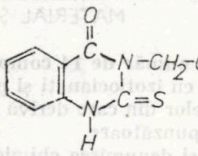
S-au luat în studiu un număr de 14 compuşi organici sintetizaţi din reacţia hidrazidelor acizilor *o*- şi *m*-aminobenzoic cu izotiocianaţi şi produşii lor de ciclizare. Pentru comparaţie s-a cercetat şi influenţa substanţelor din care derivă compuşii respectivi, adică acizii *o*- şi *m*-aminobenzoici şi hidrazidele corespunzătoare.

Formulele structurale şi denumirea chimică a compuşilor supuşi testării sînt indicate în tabela 1; în text se va folosi pe cît posibil numărul lor de ordine corespunzător din tabelă.

Pentru testarea acţiunii acestor substanţe *in vitro*, s-a utilizat ca material biologic extractul enzimatic din frunzele de *Triticum durrum* obţinute după un interval de 10—14 zile de la se-

Tabela 1

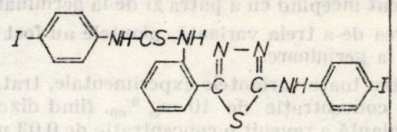
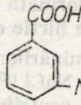
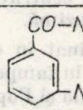
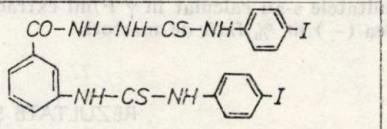
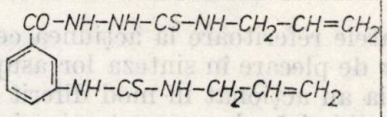
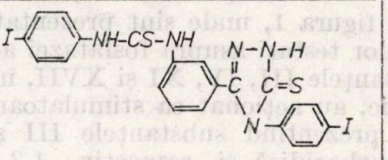
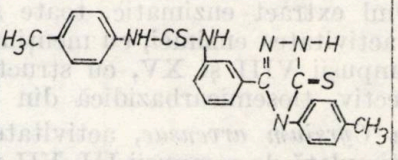
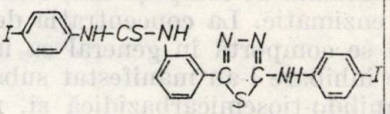
Denumirea şi formulele structurale ale compuşilor organici testaţi asupra fosfatazei acide la plante

Nr. comp.	Denumirea chimică	Formula structurală
0	1	2
I	Acidul o-aminobenzoic	
II	Hidrazida acidului o-aminobenzoic	
III	1-(o-Tiocarbanilido-carbonil)-4-fenil — tiosemicarbazida	
IV	1-(o-Tiocarbanilido-carbonil)-4-(o'-tolil)-tiosemicarbazida	
V	1-(o-Tiocarbanilido-carbonil)-4-(p'-tolil)-tiosemicarbazida	
VI	1-(o-Tiocarbanilido-carbonil)-4-(p'-iod-fenil)-tiosemicarbazida	
VII	1-(o-Tiocarbanilido-carbonil)-4-(p'-brom-fenil)-tiosemicarbazida	
VIII	N-acetil-N'-o-(p'-tolil-tiocarbamoil)-amino-benzoil-hidrazina	
IX	4-Ceto-2-tio-3-fenil-1,2,3,4-tetrahidrochinazolina	
X	4-Ceto-2-tio-3-alil-1,2,3,4-tetrahidrochinazolina	

mănare (7 zile de la răsărire în condiţii de laborator), din frunzele de *Cyrsium arvensae* recoltate în luna mai şi de la *Pelargonium zonalae*.

Materialul foliar s-a recoltat de la etajul superior, întrucît din experienţe preliminare s-a constatat că cea mai intensă activitate enzimatică o posedă frunzele de la acest etaj.

Tabela 1 (continuare)

0	1	2
XI	5-(p-iod-fenil-amino)-2-(p'-iod-fenil-tioureido-o-fenilen)-1,3,4-tiadiazol	
XII	Acidul m-aminobenzoic	
XIII	Hidrazida acidului m-aminobenzoic	
XIV	1-(m-Tiocarbanilido-carbonil)-4-(p'-iod-fenil)-tiosemicarbazida	
XV	1-[m-(N'-alil-tioureido)-benzoil]-4-alil-tiosemicarbazida	
XVI	5-Mercapto-3-(p-iod-fenil-tioureido-m-fenilen)-4-(p'-iod-fenil)-1,2,4-triazol	
XVII	5-Mercapto-3-(p-tolil-tioureido-m-fenilen)-4-(p'-tolil)-1,2,4-triazol	
XVIII	5-(p-Iod-fenil-amino)-2-(p'-iod-fenil-tioureido-m-fenilen)-1,3,4-tiadiazol	

În experienţele *in vitro*, compuşii chimici au fost adăugaţi în mediul de reacţie în concentraţie de 0,1 mg şi 0,5 mg/ml de extract enzimatic.

In vivo, experienţele s-au efectuat în diverse variante experimentale.

În prima variantă s-au tratat zilnic cîte 800 de boabe de grîu puse la germinat cu substanţa III (1-[*o*-tiocarbanilido-carbonil]-4-fenil-tiosemicarbazida), care a manifestat cea mai intensă acţiune de stimulare a activităţii fosfatazei acide, şi cu substanţa XV (1 — [*m*-(N'-alil-

tioureido)-benzoil]-4-alil-tiosemicarbazida), care a prezentat cea mai puternică inhibiţie asupra fosfatazei acide, *in vitro*.

În a doua variantă experimentală s-au utilizat aceleaşi substanţe, numai că tratarea plantelor s-a făcut începînd cu a patra zi de la germinare.

În cea de-a treia variantă, plantele au fost tratate cu aceiaşi compuşi, însă după 10 zile de punere la germinare.

Pentru toate variantele experimentale, tratamentul a durat 12 zile şi substanţele au fost utilizate în concentraţie de 10 mg $^0/_{00}$, fiind dizolvate într-o soluţie apoasă de acetonă $20^0/_{00}$. Pe fiecare plantă a revenit o concentraţie de 0,03 mg substanţă.

Martorii au fost trataţi cu apă declorinată şi cu soluţie apoasă de acetonă $20^0/_{00}$. Germinarea plantelor s-a făcut în cutii Petri, pe hîrtie de filtru.

Extractul enzimatic necesar determinărilor s-a obţinut prin triturarea materialului foliar cu sticlă pisată şi extragerea cu soluţie de NaCl $9^0/_{00}$ în raport de un gram material foliar/0,2 ml extractant, timp de o oră, după care s-a centrifugat la 4000 rot/min, timp de 20 min. Supernatantele limpezi au servit ca sursă de enzimă.

Activitatea fosfatazei s-a determinat în condiţiile citate într-o lucrare anterioară (7), folosindu-se ca substrat α-glicerofosfatul, în tampon acid citric-citrat, pH 6,2. Fosforul s-a determinat după modificarea adusă de Portocală şi Popa metodei Fiske—Subbarow (8).

Rezultatele s-au calculat în γ P/ml extract enzimatic şi s-au exprimat în creşterea (+) sau scăderea (—) în % faţă de martori.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele referitoare la acţiunea celor 14 derivaţi sintetizaţi şi a substanţelor de plecare în sinteza lor asupra activităţii fosfatazei acide arată că aceştia au acţionat în mod diferit asupra enzimei, în funcţie de structura lor chimică, de concentraţie şi de natura enzimei.

În figura 1, unde sînt prezentate rezultatele cu privire la acţiunea compuşilor testaţi asupra fosfatazei acide la *Triticum durrum*, se observă că substanţele III, IV, XI şi XVII, în concentraţie de 0,1 mg/ml extract enzimatic, au acţionat ca stimulatoare ale activităţii enzimei, acţiune mai intensă prezentînd substanţele III şi XI, cu structură tiocarbanilido-tiosemicarbazidică şi, respectiv, 1,3,4-tiadiazolică. La concentraţia de 0,5 mg/ml extract enzimatic, toate substanţele testate (I—XVIII) au inhibat activitatea enzimei, cu menţiunea că cel mai pronunţat efect l-au avut compuşii VIII şi XV, cu structură tiocarbanilidică din seria orto şi, respectiv, tiosemicarbazidică din seria meta.

La *Cyrsium arvensae*, activitatea fosfatazei acide (fig. 2) a fost intens stimulată de compuşii III, VII şi XIV în concentraţie de 0,1 mg/ml extract enzimatic. La concentraţia de 0,5 mg/ml, majoritatea derivaţilor obţinuţi se comportă în general ca inhibitori ai enzimei. Cel mai intens efect de inhibare l-au manifestat substanţele V, VI şi VIII, cu structură tiocarbanilido-tiosemicarbazidică şi, respectiv, tiocarbanilidică.

Asupra fosfatazei acide la *Pelargonium zonalae* (fig. 3), substanţele III, X şi XI, derivaţi de tiocarbanilido-tiosemicarbazide, 4-ceto-2-tio-1,2, 3,4,-tetrahidrochinazolină şi 1,3,4-tiadiazol, au potenţat activitatea enzimei în ambele concentraţii experimentate, iar compuşii V şi VIII numai în concentraţie de 0,1 mg/ml extract enzimatic. Compuşii V, VIII şi XVIII prezintă efect inhibitor în concentraţie de 0,5 mg/ml extract enzimatic, iar compusul XVII, derivat de 1, 2, 4-triazol, prezintă în ambele concentraţii testate efect inhibitor pronunţat asupra enzimei.

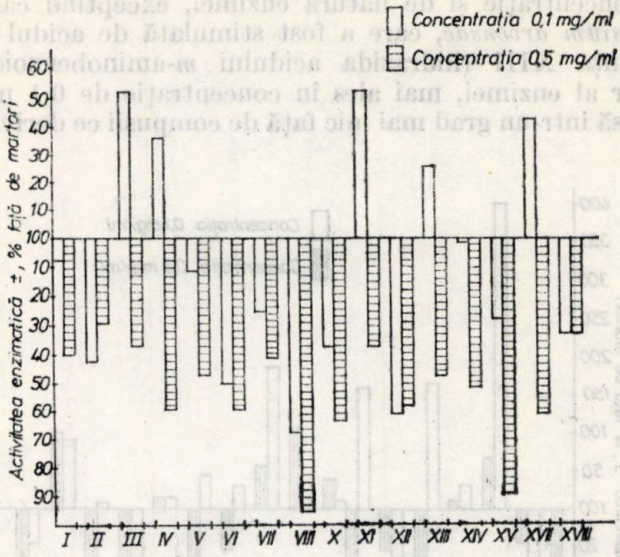

Concentrația 0,1 mg/ml
Concentrația 0,5 mg/ml
Activitatea enzimatică ±, % față de martori
I II III IV V VI VII VIII X XI XII XIII XIV XV XVII XVIII

Fig. 1. — Acţiunea acizilor *o*-(I) şi *m*-aminobenzoici (XI I) şi a hidrazidelor respective (II şi XIII), precum şi a compuşilor organici derivaţi din acestea (III, IV, V, VI , VII , VIII, X, XI, XIV, XV, XVII, XVIII, ale căror structură şi denumire chimică sînt cele indicate în tabela 1) asupra activităţii fosfatazei acide, *in vitro*, la *Triticum durrum*.

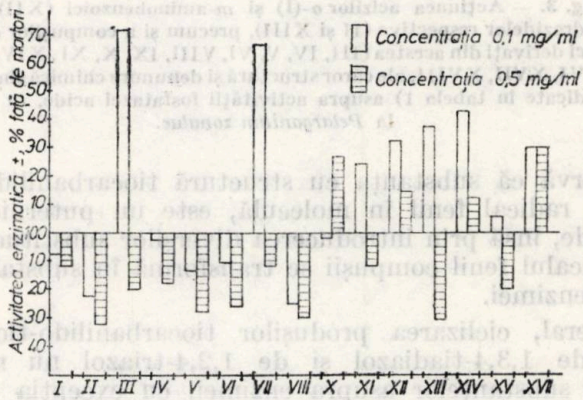

Concentrația 0,1 mg/ml
Concentrația 0,5 mg/ml
Activitatea enzimatică ±, % față de martori
I II III IV V VI VII VIII X XI XII XIII XIV XV XVII

Fig. 2.— Acţiunea acizilor *o*-(I) şi *m*-aminobenzoici (XII) şi a hidrazidelor respective (II şi XIII), precum şi a compuşilor organici derivaţi din acestea (III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI, XIV, XV, XVII, ale căror structură şi denumire chimică sînt cele indicate în tabela 1) asupra activităţii fosfatazei acide, *in vitro*, la *Cyrsium arvensae*.

Din examinarea rezultatelor prezentate înfigurile 1 — 3, se observă că substanţele de pornire în sinteza produşilor luaţi în studiu, şi anume compuşii I, II şi XII (acidul *o*-aminobenzoic, hidrazida respectivă şi acidul *m*-aminobenzoic), se comportă ca inhibitori ai activităţii enzimei, indi-

ferent de concentraţie şi de natura enzimei, exceptînd cazul fosfatazei acide la *Cyrsium arvensae*, care a fost stimulată de acidul *m*-aminobenzoic. Substanţa XIII (hidrazida acidului *m*-aminobenzoic) acţionează ca stimulator al enzimei, mai ales în concentraţie de 0,1 mg/ml extract enzimatic, însă într-un grad mai mic faţă de compuşii ce derivă din aceasta.

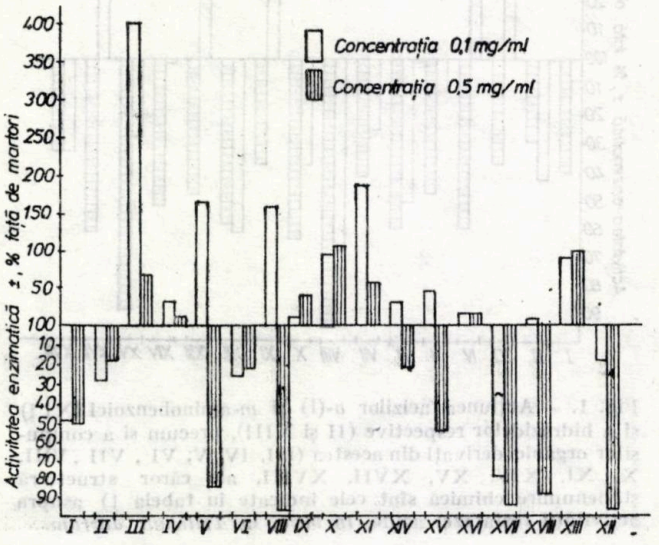


Fig. 3. — Acţiunea acizilor *o*-(I) şi *m*-aminobenzoici (XII) şi a hidrazidelor respective (II şi XIII), precum şi a compuşilor organici derivaţi din acestea (III, IV, V, VI, VIII, IX, X, XI, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, ale căror structură şi denumire chimică sînt cele indicate în tabela 1) asupra activităţii fosfatazei acide, *in vitro*, la *Pelargonium zonalae*.

Se observă că substanţa cu structură tiocarbanilido-tiosemicarbazidică, avînd radical fenil în moleculă, este un puternic stimulator al fosfatazei acide, însă prin introducerea diverşilor substituenţi (iod, brom, metil) în radicalul fenil compuşii se transformă în substanţe cu caracter inhibitor al enzimei.

În general, ciclizarea produşilor tiocarbanilido-tiosemicarbazidici în derivaţi de 1,3,4-tiadiazol şi de 1,2,4-triazol nu modifică sensul de acţiune a substanţelor asupra enzimei, cu excepţia compusului XI din seria orto, care devine stimulator al fosfatazei acide.

Modificarea sensului de acţiune a compuşilor asupra enzimei s-a produs şi atunci cînd radicalul fenil din structura tiocarbanilido-tiosemicarbazidică a fost substituit cu radicalul alil, aşa cum este, de exemplu, cazul substanţei XV.

Prin compararea datelor din figurile 1—3, se poate spune în general că intensitatea acţiunii compuşilor testaţi asupra fosfatazei acide este mai mare în cazul enzimei la *Pelargonium zonalae*, urmată de cea de la *Triticum durrum* şi apoi de cea de la *Cyrsium arvensae*, fiind legată probabil de posibilităţile de rezistenţă a plantelor.

Rezultatele *in vivo* privind acţiunea unor substanţe cu caracter inhibitor (XV) şi cu caracter stimulator (III) asupra activităţii fosfatazei acide *in vitro* arată că acestea îşi păstrează sensul de acţiune, însă în mod diferenţiat, în funcţie de stadiul de tratare.

Astfel, la plantele de *Triticum durrum* provenite din boabele tratate cu substanţa XV, din momentul în care au fost puse la germinare, activitatea fosfatazei a fost inhibată aproximativ $25^0/_{00}$ faţă de martorii trataţi cu apă şi cu soluţie apoasă de acetonă $20^0/_{00}$. Acţiunea se menţine aproximativ în aceleaşi limite şi în cazul fosfatazei plantelor tratate după 4 zile de la germinare, iar în cazul celor tratate după 10 zile de la punere la germinare inhibarea enzimei s-a produs într-un grad mai mic (fig. 4).

Este demn de semnalat faptul că, indiferent de stadiul în care au fost tratate plantele cu substanţa XV, ele au prezentat în general o dezvoltare mai redusă comparativ cu martorii, fiind caracterizate printr-un colorit galben, care a fost mai intens la plantele provenite din boabele tratate în momentul punerii la germinat.

La plantele de *Triticum durrum* tratate cu substanţa III, activitatea fosfatazei acide a fost stimulată, însă mai intens în cazul plantelor obţinute din boabele de grîu care au fost tratate din momentul punerii la germinat, urmate de plantele tratate după 4 zile de punere la germinat şi de cele tratate după 10 zile de la punere la germinat (fig. 4). În acest

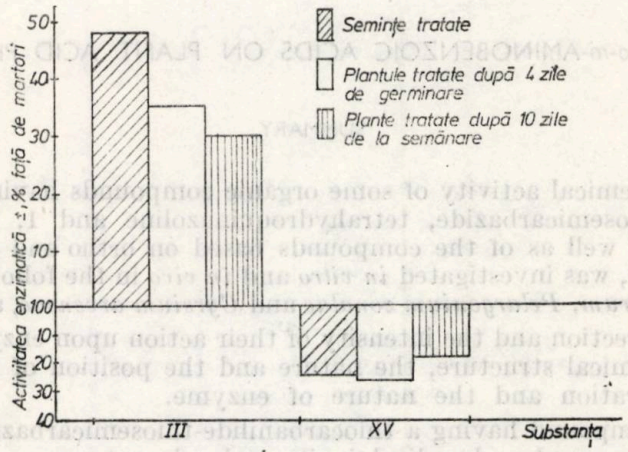


Fig. 4. — Acţiunea (1-[*o*-tiocarbanilido-carbonil]-4-fenil-tiosemicarbazida) (III) şi a (1-[*m*-(N'-alil-tioureido)-benzoil]-4-alil-tiosemicarbazida) (XV) asupra activităţii fosfatazei acide, *in vitro*, la *Triticum durrum*.

caz, plantele tratate au avut un colorit verde mai intens faţă de martori; în plus, cele provenite din boabele tratate din momentul punerii la germinare au prezentat un habitus mai înalt şi au germinat mai devreme cu două zile faţă de martori.

CONCLUZII

Dintre compuşii organici sintetizaţi din acizii orto- şi metaaminobenzoici şi hidrazidele lor, produşii cu structură tiadiazolică, triazolică şi tiocarbanilido-tiosemicarbazidică s-au dovedit a fi activi *in vitro* şi *in vivo* asupra fosfatazei acide la plante, sensul de acţiune fiind în funcţie de natura şi de poziţia substituenţilor, de concentraţie şi de natura enzimei.

Derivatul de tiocarbanilido-tiosemicarbazidă din seria orto cu radicalul fenil în moleculă acţionează ca stimulator al fosfatazei acide, iar cei cu radicalul *p*-tolil, *p*-bromfenil, *p*-iodfenil şi cu alil prezintă acţiune inhibitoare asupra enzimei atît *in vitro* cît şi *in vivo*.

Modificările activităţii enzimatice sub acţiunea substanţelor testate sînt mai intense în cazul fosfatazei acide la *Triticum durrum* şi *Pelargonium zonalae* în comparaţie cu cele de la *Cyrsium arvensae*.

S-a observat o dependenţă directă între caracterul stimulator sau inhibitor al substanţelor testate faţă de fosfataza acidă şi procesul de creştere a plantelor.

Rezultatele obţinute sugerează că activitatea fosfatazei acide poate constitui un test al eficacităţii şi al stabilirii caracterului de inhibitor sau stimulator de creştere a substanţelor cu acţiune la plante.

Prezentat la redacţie
la 20 iulie 1980

Universitatea „Al. I. Cuza", Iaşi,
Laboratorul de chimie

ACTION OF *o-m*-AMINOBENZOIC ACIDS ON PLANT ACID PHOSPHATASE

SUMMARY

The chemical activity of some organic compounds having a thiocarbanilide, thiosemicarbazide, tetrahydroquinazoline and 1, 2, 4-triazole structure, as well as of the compounds based on ortho and meta-aminobenzoic acids, was investigated *in vitro* and *in vivo* in the following plants : *Triticum durrum*, *Pelargonium zonalae* and *Cyrsium arvensae*, at pH = 6.2.

The direction and the intensity of their action upon enzymes depend on their chemical structure, the nature and the position of substituents, the concentration and the nature of enzyme.

The compound having a thiocarbanilide-thiosemicarbazide structure and containing *o*-phenyl radical in its molecule acts as a stimulant of acidic phosphatase both *in vitro* and *in vivo* as well as a stimulant of the plant growing process.

The compounds which in their structure contain one of the radicals *p*-tolyl, *p*-bromophenyl, *p*-iodinephenyl or allyl show an inhibitory activity on the enzyme and the plant growing process.

A direct dependence was observed between the inhibitor or stimulant character of the investigated compounds on acid phosphatase and the plant growing process.

This allowed us to suppose that in the case of plant treatment with active biological compounds, the measurement of acid phosphatase activity could be a test of the efficiency and it also permitted to establish the inhibitor or stimulant character on the plant growing process.

BIBLIOGRAFIE

1. E. BUDEANU, E. TANASE, An. șt. Univ. Iași, s. I, c., f. 2, **17**, 219 (1971).
2. E. BUDEANU, E. TANASE, An. șt. Univ. Iași, s. I, c., f. 1, **18**, 73 (1972).
3. E. BUDEANU, E. TANASE, An. șt. Univ. Iași, s. I, c., f. 2, **19**, 183 (1973).
4. E. TANASE, rezumatul tezei de doctorat, Inst. politehnic Iași, 1979.
5. N. TOPALĂ, E. TANASE, E. BUDEANU, E. PRICOP, Lucrările celui de-al II-lea Simpozion de microbiologie industrială, Iași, 25—26 mai 1979.
6. L. J. ANDAS, *The physiology and biochemistry of herbicides*, Academic Press, New York, 1964, p. 292.
7. V. JURCA, An. șt. Univ. Iași, s. I, c., f. 1, **19**, 113 (1968).
8. R. PORTOCALĂ, L. POPA, *Acizi ribonucleici celulari și virali*, Edit. Academiei, București, 1966, p. 318.

DINAMICA UNOR ACTIVITĂŢI ENZIMATICE LA PRODUCĂTORUL DE LIZINĂ *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* ÎN FAZA DE INOCUL ŞI FERMENTAŢIE

MAGDALENA LUNGU*, ANCA ROŞEANU*, MONA VOCIU**, ELENA SĂSĂRMAN**, S. S. VASU***, MARIA CERCEL**

Rezumat. Celulele de *Corynebacterium melassecola* s-au cultivat în condiţii de laborator şi pilot. S-a urmărit dinamica dehidrogenazelor totale, a succinat-dehidrogenazelor şi a ß-aspartat-kinazelor în inocul şi fermentaţii dezvoltate în laborator şi pilot. Nivelul activităţilor acestor enzime a fost corelat cu sinteza de lizină. S-au stabilit condiţiile optime de obţinere a inoculului, precum şi vîrsta optimă de transvazare a acestuia în fermentaţie.

Corynebacterium melassecola face parte dintre microorganismele cu importanţă industrială tot mai mare, datorită faptului că în anumite condiţii se obţin mutanţi auxotrofi, care au metabolismul dirijat către biosinteza preferenţială a lizinei şi a acumulării acesteia în mediul de cultură.

Etapele importante ce intervin în biosinteza lizinei sînt ciclul acizilor tricarboxilici (CAT) şi obţinerea acidului aspartic şi a acidului diaminopimelic, care sînt precursorii acestui aminoacid.

Enzimele din CAT sînt evident importante, deoarece nivelul lor de activitate determină gradul de utilizare al glucozei de către bacterie; de asemenea este cunoscută legătura care există între activitatea dehidrogenazelor din CAT şi capacitatea microorganismelor de a produce aminoacizi (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

Au fost efectuate studii pe *Micrococcus glutamicus* 560, care au condus la concluzia că oxidarea acizilor din CAT permite obţinerea unui randament mărit în aminoacizi. Pe de altă parte, s-a arătat că o scădere a activităţii dehidrogenazelor din CAT este legată de o mărire a producerii acizilor din CAT (de exemplu acidul malic şi acidul succinic) (1).

Se cunoaşte că mutanţii auxotrofi de *Corynebacterium*, dependenţi de homoserină, produc lizină în cantităţi de pînă la 50 g/l. La aceşti mutanţi, enzima cheie ce intervine în procesul de biosinteză a lizinei este β-aspartat-kinaza (8).

În această lucrare, bazîndu-ne pe corelaţiile dintre activităţile dehidrogenazice totale, succinat-dehidrogenazice, β-aspartat-kinazice şi cantitatea de lizină produsă de microorganism, am determinat aceste activităţi în celulele de *Corynebacterium melassecola* ICCF-16 în fază de inocul şi fermentaţie.

St. cerc. biochim., 24, 1, 71–79 (1981)

MATERIAL ŞI METODE

Pregătirea probelor. Experienţele s-au efectuat pe celule de *Corynebacterium melassecola* ICCF—16, în fază de inocul şi fermentaţie, recoltate la anumite perioade de timp. Suspensiile de celule s-au centrifugat la 5 000 rot/min, timp de 20 min, după care supernatantul, reprezentînd lichidul de cultură, a fost îndepărtat. Celulele din precipitat (stratul de culoare galbenă) s-au spălat de trei ori cu ser fiziologic şi s-au resuspendat în tampon fosfat ($K_2HPO_4 - KH_2PO_4$) 0,1 M, pH 7,4, obţinîndu-se suspensia celulară, care a fost luată în lucru.

Determinarea activităţilor enzimatice. *Activitatea dehidrogenazică totală* (DH) s-a bazat pe reducerea clorurii de 2,3,5-trifenil-tetrazoliu (TTC) (fabricaţie Merck) la formazan, un precipitat roşu, solubil în alcool etilic absolut (9).

Mediul de reacţie conţinea: 0,5 ml suspensie celulară (60 mg celule), 0,4 ml tampon fosfat 0,1 M, pH 7,4 şi 0,1 ml TTC 5 % în tampon fosfat. La martor se adaugă 5 ml alcool etilic absolut înainte de adăugarea TTC-ului. După 5—20 min incubare la 37°C, se adaugă în probă cîte 5 ml alcool etilic absolut. Se agită bine şi se imersează într-o baie de gheaţă 2 min atît probele, cît şi martorii. După centrifugare, în supernatant se determină densitatea optică (DO) la 490 nm faţă de martor. Rezultatele sînt transformate, cu ajutorul unei curbe etalon, în micromoli formazan/min/ml.

Activitatea succinat-dehidrogenazică (SDH) s-a determinat, după Kun şi Abood (10), prin reducerea sării de tetrazoliu la formazan.

Mediul de reacţie conţinea: 0,4 ml succinat de sodiu 0,2 M (fabricaţie Austranal), 0,1 ml TTC 5 % şi suspensia de celule (60 mg celule) în 1 ml volum final.

La martori s-au adăugat cîte 5 ml alcool etilic absolut înainte de adăugarea TTC-ului. După 5—20 min incubare la 37°C, în probe s-au adăugat cîte 5 ml alcool etilic absolut. Atît probele cît şi martorii se agită şi se imersează 2 min în baie de gheaţă. După centrifugare se determină în supernatant densitatea optică la 490 nm. Rezultatele s-au transformat, cu ajutorul unei curbe etalon, în micromoli formazan/ml/min la 37°C.

Activitatea ß-aspartat-kinazei (AK) s-a determinat după metoda lui Black şi Wight (11), modificată de noi.

Mediul de reacţie conţinea: 20 mM ATP (fabricaţie Serva), 100 mM acid aspartic (fabricaţie BDH), 20 mM $MgCl_2$, 400 mM hidroxilamină, suspensie celulară în tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, la 1 ml volum final. Toţi reactivii, cu excepţia clorurii de magneziu, au fost aduşi la pH 8,0 cu NaOH.

Pentru martori, suspensia celulară a fost încălzită în prealabil 5 min la 100°C şi răcită la temperatura camerei. Amestecul de reacţie conţinea aceiaşi reactivi, cu excepţia acidului aspartic, iar reacţia a fost stopată cu 1,5 ml $FeCl_3$ 10 % — TCA 3,3 % — HCl 0,7 n, înainte de adăugarea ATP-ului.

Atît probele cît şi martorii s-au incubat 30 min la 37°C, după care probele au fost stopate cu 1,5 ml $FeCl_3$ 10 % — TCA 3,3 % — HCl 0,7 n, amestec care precipită complexul format între fier şi acidul asparto-hidroxamic.

După centrifugare, în supernatant s-a determinat densitatea optică la 540 nm.

Concentraţia proteică s-a stabilit prin metoda biuretului, modificată pentru sisteme impure de Koch şi Putnam (12), determinîndu-se densitatea optică a complexului cupru-peptid la 330 nm.

Activitatea specifică a enzimelor a fost exprimată în $\frac{\text{micromoli formazan/min}}{330\ \text{nm}}$/ml pentru DH şi SDH şi în $\frac{\Delta 540\ \text{nm}}{330\ \text{nm}}$/ml pentru AK.

Lizina a fost determinată prin cromatografie pe hîrtie (fişa analitică ICCF).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dinamica activităţilor DH, SDH şi AK la inoculul dezvoltat în diferite condiţii

a. **Inoculul dezvoltat în condiţii de pilot şi de laborator** (tabela 1 şi fig. 1, *a* şi *b*).

Din datele obţinute în acest experiment rezultă că inoculul dezvoltat în pilot prezintă, pentru primele 12 ore, activităţi DH şi SDH mai mari

decît inoculul dezvoltat în laborator. După acest interval se observă un ritm de creștere a activităților enzimatice mai intens pentru inoculul dezvoltat în condiții de laborator.

Tabela 1

Dinamica activității dehidrogenazice totale, succinat-dehidrogenazice și aspartat-kinazice în inoculul pilot și de laborator la *Corynebacterium melassecola* ICCF — 16

Vîrsta inoculului (ore)	Parametrii biochimici testați			
	DH*	SDH*	AK**	lizină (g/l)
0 Pilot	0	0	0	0
Laborator	0	0	0	0
8 Pilot	0,030	0,040	0,026	33,8
Laborator	0,004	0,016	0,025	28,1
12 Pilot	0,030	0,040	0,027	39,8
Laborator	0,010	0,016	0,027	26,3
16 Pilot	0,013	0,020	0,025	37,9
Laborator	0,013	0,022	0,031	27,2
20 Pilot	0,005	0,005	0,037	33,9
Laborator	0,007	0,015	0,013	30,0
24 Pilot	0,002	0,006	0,035	35,5
Laborator	0,004	0,013	0,034	26,8
48 Pilot	—	—	—	—
Laborator	0	0,003	0,032	22,1
72 Pilot	—	—	—	—
Laborator	0	0,0003	0,016	30,0

* $\frac{\mu\text{moli formazan/min}}{\varepsilon 330\text{ nm}}$ /ml

** $\frac{\Delta 540\text{ nm}}{\varepsilon 330\text{ nm}}$ /ml

În ceea ce privește nivelul AK, nu se observă modificări foarte semnificative între experiența realizată în pilot și cea din laborator. Între 8 și 12 ore, activitățile enzimatice sînt practic aceleași, obținîndu-se o ușoară creștere începînd cu 16 ore.

Pe baza acestor rezultate considerăm că activitățile DH și SDH ar putea fi luate drept parametri pentru caracterizarea inoculului în vederea transvazării în fermentație. Deci, am putea spune că, în condițiile de lucru date, vîrsta optimă de transvazare este cuprinsă în intervalul 12—16 ore.

Nivelul AK, în condițiile date, fără să constituie un criteriu de caracterizare a inoculului, poate da indicații asupra capacității productive în lizină a fazei inocul.

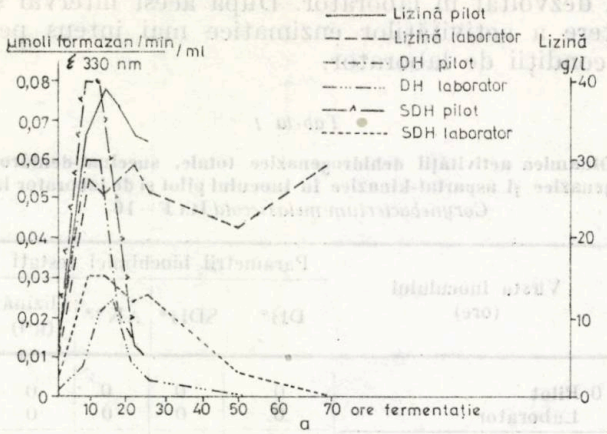


Fig. 1. — *a*, Dinamica activităţilor DH şi SDH în inocul pilot şi laborator şi lizina obţinută cu cele două inocule.

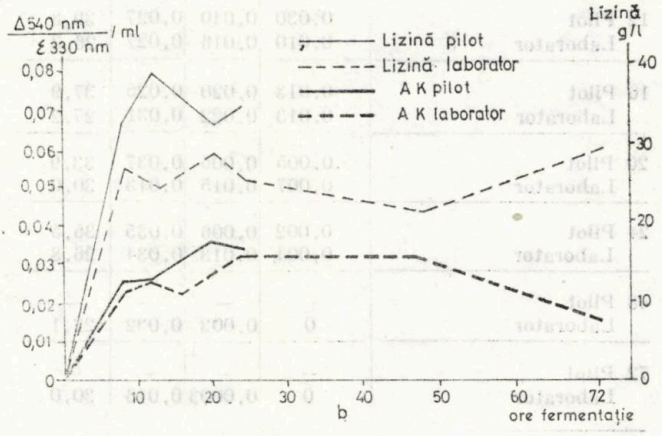


Fig. 1. — *b*, Dinamica activităţii AK în inocul pilot şi laborator şi lizina obţinută cu cele două inocule.

Cantitatea de lizină este în general mai mare în condiţiile inoculului dezvoltat în pilot.

b. Inoculul dezvoltat în pilot în două fermentatoare diferite — F_9 şi F_6 (tabela 2).

Tabela 2

Parametrii tehnici pentru fermentatoarele F_9 şi F_6

Parametrii tehnici	Inocul F_6	Inocul F_9
0°C	31°C	31°C
Presiune	0,5 atm	0,5 atm
Debit aer	0,4 l/litri mediu/min	0,3 l/litri mediu/min
Turaţie	280 rot/min	200 rot/min

După cum se vede din tabelă, cele două fermentatoare sînt diferite din punctul de vedere al debitului de aer și al turației/minut.

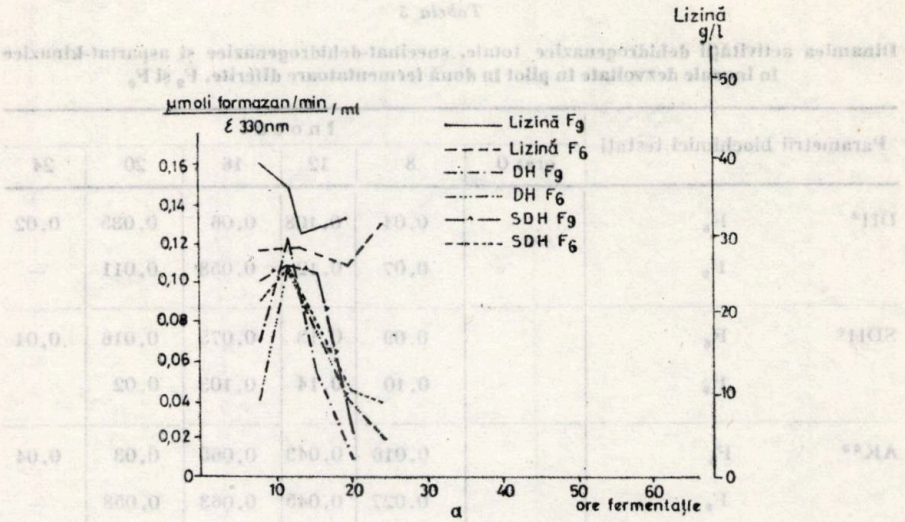


Fig. 2. — *a*, Dinamica activităților DH și SDH în inoculele dezvoltate în F_9 și F_6 și lizina obținută cu aceste inocule.

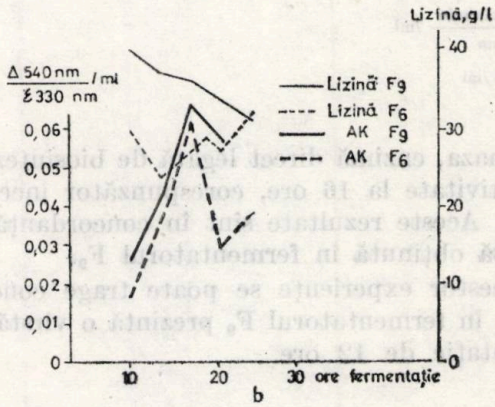


Fig. 2. — *b*, Dinamica activității AK în inoculele dezvoltate în F_9 și F_6 și lizina obținută cu aceste inocule.

Din tabela 3 și figura 2 se poate observa că inoculul dezvoltat în condițiile fermentatorului F_9 dă rezultate mai bune decît inoculul dezvoltat în fermentatorul F_6. Pentru inoculul din F_9, DH și SDH prezintă un maxim

de activitate la 12 ore, fapt verificat şi în experienţa anterioară, ceea ce este în legătură cu dezvoltarea culturii, acest interval reprezentînd sfîrşitul fazei logaritmice de creştere a microorganismului.

Tabela 3

Dinamica activităţii dehidrogenazice totale, succinat-dehidrogenazice şi aspartat-kinazice în inocule dezvoltate în pilot în două fermentatoare diferite, F_6 şi F_9

Parametrii biochimici testaţi		Inocul					
		ore: 0	8	12	16	20	24
DH*	F_6		0,04	0,108	0,06	0,035	0,02
	F_9		0,07	0,12	0,058	0,011	—
SDH*	F_6		0,09	0,13	0,075	0,016	0,04
	F_9		0,10	0,14	0,103	0,02	
AK**	F_6		0,016	0,043	0,065	0,03	0,04
	F_9		0,027	0,045	0,063	0,058	—
Lizină (g/l)	F_6		29,4	23,4	29,4	27,4	32,5
	F_9		40	37,7	31,2	33,8	—

* $\frac{\mu\text{moli formazan/min}}{\varepsilon 330\ \text{nm}}$ /ml

** $\frac{\Delta 540\ \text{nm}}{\varepsilon 330\ \text{nm}}$ /ml

Aspartat-kinaza, enzimă direct legată de biosinteza lizinei, prezintă un maxim de activitate la 16 ore, corespunzător începerii perioadei de biosinteză activă. Aceste rezultate sînt în concordanţă cu producţia de lizină mai ridicată obţinută în fermentatorul F_9.

În urma acestor experienţe se poate trage concluzia că inoculul dezvoltat în pilot în fermentatorul F_9 prezintă o vîrstă optimă de transvazare în fermentaţie de 12 ore.

Dinamica activităţilor DH, SDH şi AK la fermentaţii obţinute în pilot şi laborator

Stabilindu-ne la vîrsta optimă de transvazare şi la condiţiile optime de obţinere a inoculului (fermentatorul F_9), în continuare am determinat care este dinamica DH, SDH şi AK în fermentaţii pilot şi laborator (tabela 4 şi fig. 3, *a* şi *b*).

Tabela 4

Dinamica activității dehidrogenazice totale, succinat-dehidrogenazice și aspartat-kinazice în fermentație-pilot și fermentație-laborator

Parametrii biochimici testați		Inocul				Fermentație					
		ore: 0	8	12	16	8	12	16	24	48	72
DH*	Laborator	0	0,063	0,105	0,052	0,06	0,079	0,09	0,05	0,008	—
	Pilot					0	0,031	0,072	0,056	0,014	—
SDH*	Laborator					0,082	0,097	0,103	0,102	0,006	
	Pilot	0	0,094	0,13	0,056	0	0,051	0,078	0,097	0,03	—
AK**	Laborator					0,006	0,0078	0,022	0,020	0,018	—
	Pilot	0	0,02	0,022	0,032	0,01	0,018	0,0179	0,028	0,03	—
Lizină (g/l)	Laborator					—	—	—	10,3	19,4	30,0
	Pilot					—			10,4	23,8	35,0

* $\frac{\mu moli\ formazan/min}{\varepsilon 330\ nm}$ /ml ** $\frac{\Delta 540\ nm}{\varepsilon 330\ nm}$ /ml

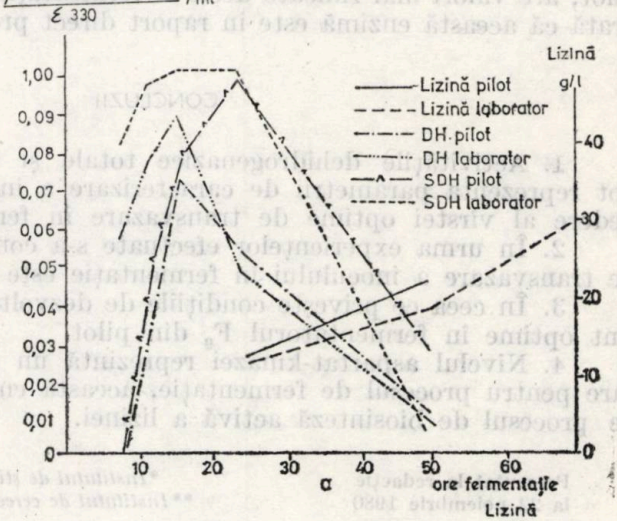


Fig. 3. — *a*, Dinamica activităților DH și SDH în fermentația pilot și de laborator și lizina obținută în cele două fermentații.

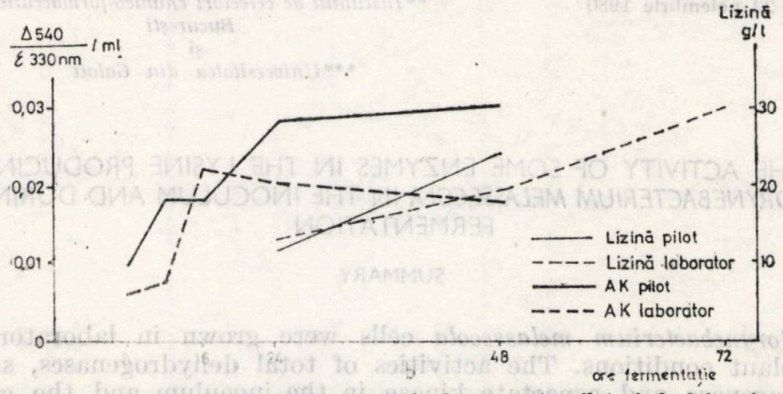


Fig. 3. — *b*, Dinamica activității AK în fermentația pilot și de laborator și lizina obținută în cele două fermentații.

Rezultatele cuprinse în tabela 4 indică pentru inocul un maxim de activitate pentru DH şi SDH la 12 ore, iar pentru AK un maxim de activitate la 16 ore. Aceste rezultate sînt în concordanţă cu cele obţinute în experienţele anterioare.

Referitor la fermentaţiile din pilot şi laborator nu se constată diferenţe din punctul de vedere al dinamicii enzimelor studiate. Urmărind activitatea DH, aceasta prezintă un maxim la 16 ore; SDH şi AK prezintă maximum de activitate în intervalul 16—24 ore. În valori absolute, DH şi SDH prezintă activităţi mai mari la fermentaţiile obţinute în laborator faţă de cele obţinute în pilot. Urmărind cantitatea de lizină, aceasta este mai mare la fermentaţia obţinută în pilot. Din aceste rezultate reiese că între cantitatea de lizină şi nivelul activităţilor DH şi SDH există un raport invers de proporţionalitate, fapt constatat şi de Grivin (13) la unii mutanţi de *Brevibacterium*. Acesta a observat că la tulpinile care sintetizează lizină activitatea succinat-dehidrogenazică este mai mică decît la mutantele care nu sintetizează lizină.

În ceea ce priveşte AK, se observă că, la fermentaţiile obţinute în pilot, are valori mai ridicate decît la fermentaţiile din laborator, ceea ce arată că această enzimă este în raport direct proporţional cu lizina.

CONCLUZII

1. Activităţile dehidrogenazice totale şi succinat-dehidrogenazice pot reprezenta parametrii de caracterizare a inoculului din punctul de vedere al vîrstei optime de transvazare în fermentaţie.
2. În urma experienţelor efectuate s-a constatat că vîrsta optimă de transvazare a inoculului în fermentaţie este de 12 ore.
3. În ceea ce priveşte condiţiile de dezvoltare a inoculului, acestea sînt optime în fermentatorul F_9 din pilot.
4. Nivelul aspartat-kinazei reprezintă un parametru de caracterizare pentru procesul de fermentaţie, această enzimă fiind direct legată de procesul de biosinteză activă a lizinei.

Prezentat la redacţie
la 22 noiembrie 1980

*Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti,
**Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucureşti
şi
***Universitatea din Galaţi

THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN THE LYSINE PRODUCING *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* IN THE INOCULUM AND DURING FERMENTATION

SUMMARY

Corynebacterium melassecola cells were grown in laboratory and pilot plant conditions. The activities of total dehydrogenases, succinic dehydrogenase and aspartate kinase in the inoculum and the growing culture, in laboratory and pilot plant conditions, have been determined.

The activity of various enzymes was correlated with the yield of lysine synthesized by the bacterium. We have established the optimum conditions for obtaining the inoculum and the moment for transferring it to the fermentation.

BIBLIOGRAFIE

1. K. KIMURA, J. Gen. appl. Microbiol., **10,** 23 (1964).
2. V. LAGANMAFHAN, F. SCHWEEF, J. biol. Chem., **196,** 551 (1952).
3. H. MOYED, D. O'KONE, J. biol. Chem., **195,** 551 (1952).
4. G. SEAMAN, J. gen. Physiol., **34,** 1115 (1951).
5. I. SHIIO, S. OTSUKA, M. TAKAHASHI, J. Biochem., **46,** 1303 (1959).
6. A. KOPOTOEV, Mikrobiologia, **30,** 47 (1961).
7. A. KOPOTOEV, Mikrobiologia, **35,** 174 (1966).
8. W. FRITECHE, *Biochemische Grundlagen der industriellen Mikrobiologie*, Gustav Fischer — Verlag, Jena, 1977, p. 105.
9. E. RYSSOV, W. NIELSEN, Water Research, **2,** 1179—1185 (1975).
10. E. KUN, I. G. ABOOD, Science, **109,** 144—146 (1949).
11. S. BLACK, N. H. WIGHT, J. biol. Chem., **213,** 27 (1955).
12. A. L. KOCH, S. L. PUTNAM, Anal. Biochem., **44,** 239 (1971).
13. P. GRIVIN, Priklad. Biohim. Mikrobiol., **4,** *1*, 22 (1962).

CERCETĂRI ASUPRA PIGMENŢILOR CAROTENOIDICI DIN *SOLANUM LACINIATUM* AIT. ŞI CULTURILE DE ŢESUTURI ALE ACESTEI PLANTE

ERSILIA MUNTEANU, DOINA OŞIANU, C. BODEA

Rezumat. S-a cercetat conţinutul în pigmenţi carotenoidici din ţesuturile de calus şi organele plantei *Solanum laciniatum* Ait. Atît planta, cît şi culturile de ţesuturi ale acestei plante au capacitatea de a sintetiza carotenoide hidrocarburice şi oxigenate, cantitatea acestor pigmenţi fiind foarte mică în ţesuturile de calus.

Solanum laciniatum Ait., specie valoroasă a genului *Solanum*, a fost cercetată, ca de altfel şi culturile de ţesuturi provenite din diferite organe ale acestei plante, în special pentru conţinutul în compuşi steroidici utilizabili ca materie primă în industria farmaceutică (1)—(4).

Prezentele cercetări, efectuate în completarea studiilor noastre asupra compuşilor steroidici, se referă la o altă grupă de terpenoide naturale, şi anume la pigmenţii carotenoidici. Carotenoidele sînt compuşi naturali valoroşi, avînd aceiaşi precursori metabolici cu steroidele. Biosinteza acestor două grupe de substanţe nu se exclude, ci, dimpotrivă, sinteza steroidelor în ţesuturi poate indica existenţa unor condiţii favorabile şi pentru apariţia carotenoidelor.

În literatura de specialitate se cunosc relativ puţine date referitoare la pigmenţii carotenoidici din planta *Solanum laciniatum* Ait. Astfel, Kuzneţova a studiat conţinutul în alcaloizi şi pigmenţi carotenoidici din frunzele plantelor de *Solanum laciniatum* cultivate pe un fond îngrăşat în condiţiile iluminării cu lămpi luminescente roşii şi albastre (5).

În ceea ce priveşte biosinteza carotenoidelor în culturi de ţesuturi, ea a fost studiată în special în culturile de *Daucus carota* (6), (7), neexistînd referiri asupra sintezei acestor pigmenţi în culturile de *Solanum laciniatum*.

În lucrarea de faţă am cercetat pigmenţii carotenoidici din diferite organe ale plantei *Solanum laciniatum*, precum şi din culturile de ţesuturi provenite din aceste organe, cu scopul de a sesiza eventuale asemănări sau deosebiri în ceea ce priveşte biosinteza carotenoidelor *in vivo* şi *in vitro*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost efectuate identificări şi dozări de pigmenţi carotenoidici din lăstarii, frunzele şi rădăcinile plantei *Solanum laciniatum* Ait., precum şi din culturile de ţesuturi de frunză, lăstari şi rădăcină ale acestei plante.

Plantele analizate au fost cultivate în cîmp, iar ţesutul de calus a fost subcultivat în mod repetat (timp de 102 săptămîni calusul de frunză, 58 săptămîni calusul de lăstari şi 48 săptămîni calusul de rădăcină) în recipiente de cultură cu mediu proaspăt, amplasate în termostat cu lumină artificială asigurată de tuburi fluorescente, la o intensitate luminoasă de 700 — 1 500 lucşi şi o umiditate relativă de circa 70%. Calusul analizat a fost cultivat pe mediul mineral Murashige—Skoog (8) agarizat, suplimentat cu substanţe de creştere, diferind doar prin natura auxinei (acidul 2,4-diclorfenoxiacetic sau acidul α-naftilacetic) (9)—(11). Ţesutul parenchimatic s-a prezentat, indiferent de provenienţă, vîrstă şi varianta de mediu, sub forma unor agregate de granule de culoare gălbuie luminoasă, uneori chiar verde-gălbuie (12).

Extracţia pigmenţilor carotenoidici. Materialul recoltat şi uscat a fost fin pulverizat şi supus extracţiei Soxhlet timp de 24 de ore cu eter de petrol şi 8 ore cu benzen. Extractele reunite au fost concentrate şi supuse saponificării cu KOH etanolic 5% (părţi egale) la temperatura camerei, peste noapte.

Separarea şi dozarea pigmenţilor carotenoidici. Extractele saponificate au fost spălate, uscate pe Na_2SO_4 anhidru şi cromatografiate pe coloană de MgO — celită 1:1. Pentru developarea cromatogramei s-a utilizat un amestec de eter de petrol-eter etilic pînă la 15%. Zonele de pigmenţi au fost separate mecanic şi s-au eluat cu eter de petrol ce conţinea 2% alcool etilic. Soluţiile de pigmenţi s-au spectrofotometrat la un Spectrofotometru Zeiss UV—VIS.

Calcularea cantităţii de pigment s-a făcut după formula:

$$\text{mg pigment } \% = \frac{\varepsilon \times V \times 100 \times 1\,000}{E^{1\%}_{1cm} \times G \times 100},$$

unde

ε = extincţia la λ maxim
V = volumul soluţiei (cm^3)
$E^{1\%}_{1cm}$ = extincţia specifică
G = greutatea materialului analizat (g)

Identificarea pigmenţilor carotenoidici separaţi s-a făcut prin procedee fizico-chimice şi chimice. Astfel s-au stabilit maximele de absorbţie în vizibil, repartiţia în eter de petrol-MeOH 95% (13) şi s-au efectuat cocromatograme cu pigmenţi autentici, utilizîndu-se cromatografia în strat subţire.

Pentru punerea în evidenţă a grupărilor OH alilice s-a efectuat reacţia de deshidratare cu cloroform acid (14), iar evidenţierea grupării epoxidice a violaxantinei s-a făcut prin reacţia de culoare în HCl şi prin transformarea acestei grupări în grupare furanoidoxidică (15).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele cercetărilor privind pigmenţii carotenoidici din diferite organe ale plantei *Solanum laciniatum* Ait. sînt prezentate în tabela 1. Din aceste date se constată că în planta analizată se sintetizează pigmenţii carotenoidici comuni, prezenţi de altfel în aproape toate ţesu-

Tabela 1

Conţinutul în carotenoide din diferite organe ale plantei *Solanum laciniatum* Ait. (mg/100 g material uscat)

Nr. crt.	Pigmentul carotenoidic	Organul			Maxime de absorbţie (nm) (eter de petrol)
		frunze	lăstari	rădăcini	
1	β-Carotina	1,16	0,40	—	(423)—450—480
2	Criptoxantina	0,65	1,13	—	425—450—482
3	Zeaxantina	6,06	1,41	—	425—450—482
4	Luteina	62,40	6,16	—	420—445—475
5	Violaxantina	2,60	1,24	—	—440—470
	Total	72,87	10,34	—	

turile verzi. Dintre carotenoidele hidrocarburice este prezentă numai β-carotina, și aceasta într-o proporție destul de redusă față de totalul de pigmenți carotenoidici.

Carotenoidele oxigenate (xantofilele) dețin ponderea principală a pigmenților carotenoidici, luteina dovedindu-se pigmentul major atît în frunze cît și în lăstari. Prezentele cercetări au evidențiat în frunzele și în lăstarii plantei, pe lîngă luteină și violaxantină, semnalate de către Kuznețova (5), și alte xantofile, cum sînt criptoxantina și zeaxantina. Prezența violaxantinei (diepoxi-zeaxantina) este pe deplin justificată dat fiind rolul ei de donor și acceptor de electroni, respectiv de oxigen în procesul de fotosinteză.

Comparîndu-se conținutul total de pigmenți carotenoidici din frunze și lăstari, se constată o sinteză mult mai activă în frunze, ele fiind de fapt sediul principal al biosintezei substanțelor organice.

În rădăcină, după cum era de așteptat, nu există pigmenți carotenoidici, după cum nu există nici pigmenți clorofilieni.

Analizîndu-se culturile de țesuturi ale plantei *Solanum laciniatum* Ait., se constată că ele au capacitatea de a sintetiza pigmenți carotenoidici hidrocarburici și oxigenați (tabela 2). Cantitatea de carotenoide sintetizate în aceste culturi este foarte mică însă în comparație cu cea din organele similare ale plantei.

Pigmenții preponderenți în culturile de țesuturi sînt β-carotina și luteina, lipsind în totalitate violaxantina.

Spre deosebire de rădăcina plantei, calusul de rădăcină conține carotenoide, și anume β-carotină și luteină.

Tabela 2

Conținutul în carotenoide din culturile de țesuturi ale plantei *Solanum laciniatum* Ait. (μg/100 g material uscat)

Nr. crt.	Pigmentul carotenoidic	Calus			Maxime de absorbție (nm) (eter de petrol)
		frunze	lăstari	rădăcini	
1	β-Carotina	40	13,5	31	(423)—450—480
2	Criptoxantina	—	30	—	425—450—482
3	Zeaxantina	4	6	—	425—450—482
4	Luteina	32	151	105	420—445—475
5	Violaxantina	—	—	—	—
	Total	76	205,5	136	

Este interesant de remarcat că, dintre culturile analizate, calusul de lăstari conține cantitatea cea mai mare și mai variată de pigmenți carotenoidici. În aceste culturi de lăstari apare criptoxantina, pigment carotenoidic monohidroxilic, precursor al carotenoidelor dihidroxilice.

CONCLUZII

1. Ţesuturile verzi ale plantei *Solanum laciniatum* Ait. sintetizează pigmenţi carotenoidici comuni, hidrocarburici şi oxigenaţi (β-carotina, criptoxantina, zeaxantina, luteina şi violaxantina).

2. Culturile de ţesuturi din organele acestei plante, indiferent de proveniență, au capacitatea de a sintetiza pigmenţii carotenoidici prezenţi în plantă, cu excepţia violaxantinei (diepoxi-zeaxantina).

3. Cantitatea de carotenoide sintetizate de ţesuturile de calus este de circa 1 000 de ori mai mică decît cea sintetizată în organele verzi ale plantei *Solanum laciniatum* Ait.

Prezentat la redacţie
la 5 septembrie 1980

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj-Napoca

STUDIES ON CAROTENOID PIGMENTS IN *SOLANUM LACINIATUM* AIT. AND THE TISSUE CULTURES OF THIS PLANT

SUMMARY

The content of carotenoid pigments in callus tissues and organs of *Solanum laciniatum* Ait. has been investigated. Both the plant and the tissue cultures are able to synthetize hydrocarbonic and oxygenated carotenoids, the quantity of these pigments being very small in callus tissues.

BIBLIOGRAFIE

1. J. ŘEŘÁBEK, Biol. Plant, **9**, 285 (1967).
2. D. VÁGÚJFALVI, M. MAROTI, P. TÉTÉNYI, Phytochemistry, **10**, *1*, 389 (1971).
3. J. H. SUPNIEWSKA, B. DOHNAL, Dissert. Pharm. Pharmacol., **XXIV**, 193 (1972).
4. N. HOSODA, M. YATAZAWA, Agric. Biol. Chem., **43**, 82 (1979).
5. T. A. KUZNEŢOVA, Fiziol. rastenii, **18**, 12(1971).
6. C. MAK MACHTELD, W. H. GABELMAN, F. SKOOG, J. amer. Soc. hortic. Sci., **101**, 442 (1976).
7. K. SHIMIZU, T. KIKUCHI, N. SUGANO, A. NISHI, Physiol. Plant, **46**, *2*, 127 (1979).
8. T. MURASHIGE, F. SKOOG, Physiol. Plant, **15**, 473 (1962).
9. E. MUNTEANU, M. FLORESCU, Probleme de genetică teoretică şi aplicată, **VIII**, *3*, 131 (1976).
10. E. MUNTEANU, Bul. Inst. agr., Cluj-Napoca, **30**, 41 (1976).
11. E. MUNTEANU, Bul. Inst. agr., Cluj-Napoca, **32**, 93 (1978).
12. E. MUNTEANU, M. DRĂGAN—BULARDA, Bul. Inst. agr., Cluj-Napoca, **31**, 41 (1977).
13. F. G. PETRACEK, L. ZECHMEISTER, Anal. Chem., **28**, 1484 (1956).
14. P. KARRER, E. LEUMAN, Helv. chim. Acta, **34**, 445 (1951).
15. P. KARRER, E. JUCKER, *Carotenoids*, Elsevier, NewYork, 1950, 7.

CERCETĂRI FITO-BIOCHIMICE ASUPRA PLANTEI *XANTHIUM SPINOSUM* L.

P. PETCU, ECATERINA ANDRONESCU, D. BEDELEANU*, VICTORIA BORZA*

Rezumat. S-a întreprins studiul fito-biochimic pentru determinarea calitativă a compoziţiei chimice a plantei *Xanthium spinosum* L. Cu această ocazie s-a evidenţiat prezenţa derivaţilor fenil-propanoici (de tipul acidului cafeic şi clorogenic), a flavonelor, fitosterolilor, saponinelor triterpenice nehemolitice, a taninului şi a uleiului volatil.

Avînd în vedere că prin cercetări biochimice se pot cunoaşte azi procesele metabolice care cauzează şi condiţionează bolile la nivel celular, se caută din ce în ce mai mult să se determine şi acţiunea medicamentelor şi chiar a extractelor vegetale asupra particulelor subcelulare.

Pentru a valorifica datele ce pot fi obţinute prin aceste studii, autorii au întreprins cercetări experimentale asupra acţiunii extractelor 20% de *Xanthium spinosum* L. şi *Mentha piperita* L. la nivelul particulelor subcelulare obţinute prin fracţionarea omogenatului hepatic şi renal al şobolanilor normali şi al celor supuşi pretratamentului cu aceste extracte.

Din interpretarea rezultatelor, primele de acest fel din literatura de specialitate, referitoare la studiul acestor plante, se poate considera că efectul extractelor de *Xanthium* şi *Mentha* implică intervenţia lor în mecanismul de reglare a proceselor biochimice cu punctul de impact la nivelul energogenezei mitocondriale. În acest mod, ele asigură procesele fundamentale ale celulei şi se opun excesului caracteristic proceselor patologice consumatoare de energie.

Planta *Xanthium spinosum* L., cunoscută sub numele de ghimpe, dracilă, holeră (1), a fost puţin studiată şi utilizată atît la noi cît şi în străinătate.

Din punctul de vedere al utilizării medicinale, ghimpele este foarte puţin citat în literatura de specialitate, iar medicina populară îl menţionează foarte rar. Aflînd din empirismul popular că această plantă se utilizează în unele afecţiuni ale căilor urinare cu rezultate bune, am întreprins un studiu fito-biochimic asupra speciei *Xanthium spinosum* L. Literatura de specialitate consultată (2), (3), (4), (5), (6), (7) cuprinde date fitochimice sporadice şi adesea controversate asupra compoziţiei chimice a speciilor de *Xanthium*.

Pornind de la aceste considerente, studiul fito-biochimic abordat are drept scop cunoaşterea compoziţiei chimice şi a proceselor metabolice la nivelul particulelor subcelulare ale speciei *Xanthium spinosum* L. comparativ cu *Mentha piperita*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materia primă a fost constituită din părţile aeriene ale acestei plante recoltate de l Vaida Cămăraş (jud. Cluj) în luna septembrie 1976, uscată şi măcinată la gradul de fineţe a sitei V (8).

Cercetările fitochimice au evidenţiat prezenţa flavonelor, a derivaţilor fenil-propanoic (de tipul acidului cafeic şi clorogenic), a fitosterolilor, saponinelor, taninului şi a uleiului volatil

Identificarea derivaţilor fenil-propanoici s-a făcut în extractul metanolic, care a fost supus cromatografierii pe hîrtie Watmann 4, folosind tehnica ascendentă cu eluant HCl 1 N şi substanţă de referinţă: acid cafeic şi acid clorogenic soluţie 0,1 %.

Datorită prezenţei în plantă a taninului compus, care din punct de vedere biogenetic face parte din grupa derivaţilor fenil-propanoici, ne-am îndreptat atenţia spre compuşii cu origine biogenetică similară, şi anume asupra compuşilor flavonici.

Flavonele s-au identificat în extractul etanolic prin cromatografie pe hîrtie Watmann 4, în sistem ascendent Forestal pentru glicozide, iar după hidroliza cu acid clorhidric s-au identificat agliconii flavonici tot prin cromatografie pe hîrtie Watmann 4, folosind sistemul ascendent Forestal pentru agliconi, iar ca substanţe de referinţă crizină, cvercetol, morină, kemferol şi robinină.

Flavonozidele au mai fost identificate în soluţia alcoolică tratată cu HCl concentrat + magneziu sau zinc metalic, încălzită la fierbere, cînd apare coloraţia roşie datorită reducerii flavonelor la antocianidolii corespunzători.

Fitosterolii au fost identificaţi în reziduul extractului eteric, dizolvat în cloroform, în prezenţa anhidridei acetice şi a acidului sulfuric, cînd prin răcire la zona de contact apare un inel brun, iar stratul supernatant se colorează în verde.

Saponinele s-au pus în evidenţă din soluţiile etanolice reunite, filtrate şi lăsate la frigider, timp în care se depune saponina brută. Sedimentul separat se dizolvă în etanol, la care prin adăugare de eter etilic precipită saponina. O parte din această saponină s-a dizolvat în apă şi asupra acesteia s-au determinat indicele de saponificare, indicele hemolitic şi cîmpul hemolitic (9).

Taninul (10)—(13) a fost pus în evidenţă prin reacţii de precipitare cu soluţia de gelatină 1 %, soluţia de acetat de cupru 5 % şi prin reacţia de colorare cu soluţia de clorură ferică 5 %. Determinarea cantitativă a taninului s-a făcut după metoda descrisă în „Farmacopeea română" (14).

Uleiul volatil s-a extras prin distilarea materialului vegetal cu vapori de apă (8).

Cercetările biochimice au urmărit acţiunea extractului apos de *Xanthium spinosum* L. comparativ cu *Mentha piperita* L., ale cărei efecte se cunosc a fi lipsite total de reacţii adverse, la nivelul particulelor subcelulare obţinute prin fracţionarea omogenatului hepatic şi renal al şobolanilor normali şi al celor supuşi unui pretratament cu aceste extracte.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizînd tabela 1 rezultă că spotul acidului cafeic şi clorogenic, la lumina UV, prezintă fluorescenţă albastră, care se modifică la tratarea cromatogramei cu vapori de amoniac, colorindu-se în verde în prezenţa acidului clorogenic, iar în prezenţa acidului cafeic rămîne albastră, dar se intensifică. Prin pulverizarea cromatogramei cu o soluţie 2,5 % $AlCl_3$ şi examinarea la UV, acizii cafeic şi clorogenic prezintă fluorescenţă albastră, pe cînd alţi compuşi fenolici, cum sînt flavonele, dau fluorescenţă galben-verzuie. Din tabelă se mai constată două spoturi diferite — un spot cu Rf = 0,45 de fluorescenţă galben-citrin, care este identic cu cvercetolul, şi al doilea spot cu Rf = 0,70 de fluorescenţă galben-portocalie, cu Rf-ul apropiat de al morinei, dar care se deosebeşte de acesta prin culoarea galben-portocalie. Ultimul flavonol este nou şi urmează să fie determinat.

Saponinele au dat reacţii pozitive prin determinarea indicelui de spumificare, iar indicele hemolitic şi cîmpul hemolitic au fost negative, fapt care ne determină să le considerăm saponine nehemolitice.

Referitor la calitatea taninului, acesta este de natură catehică, dînd reacţii de culoare verde închis cu $FeCl_3$ soluţie 5 %, caracteristică taninului catehic. Reacţia nu este specifică taninului, ci este o reacţie generală a fenolilor, dar, cu toate acestea, noi considerăm că taninul prezent în plantă este de natură catehică.

Tabela 1

Rezultatele fitochimice asupra plantei *Xanthium spinosum* L.

Soluția folosită	Soluția substanțelor de referință	Rf-urile flavonelor		Rf-urile derivaților fenil-propanoici în HCl 1N		Culoarea în UV cu $AlCl_3$
		Forestal glicozide	Forestal agliconi	acid cafeic	acid clorogenic	
Extract cu flavonozide	—	0,35	—	—	—	galben-brună
Extract cu flavonoide	—	—	0,45 0,70	—	—	galben-citrin galben-portocalie
Soluția cu derivații fenil-propanoici	—	0,84	—	0,28	0,58	albastră
—	sol. acid cafeic	—	—	0,28	—	albastră
—	sol. acid clorogenic	—	—	—	0,58	albastră
—	sol. crizină	—	0,58	—	—	galben-portocalie
—	sol. cvercetol	—	0,45	—	—	galben-citrin
—	sol. kemferol	—	0,60	—	—	galben-citrin
—	sol. morină	—	0,72	—	—	galben-verzuie
—	sol. robinină	—	0,82	—	—	galben-verzuie

După determinările noastre, taninul se găsește în *Xanthium spinosum* L. în proporție de 2,72 g%.

Uleiul volatil se prezintă sub forma unui lichid uleios de culoare galben-portocalie cu miros caracteristic, asemănător cu cel de mucegai, iar gustul este grețos.

Experimentările biochimice ale extractului apos de *Xanthium spinosum* L. 20% și de *Mentha piperita* L. 20% s-au efectuat atît *in vitro*, cît și *in vivo*.

Cercetările *in vitro* au fost întreprinse pe mitocondriile hepatice de șobolani după metoda Hogeboom, în prezența extractelor menționate, la o concentrație finală de 0,02 și 0,04 ml extract pe 2 ml volum de reacție.

În cercetările *in vivo*, unui lot de 8 șobolani albi masculi cu greutatea în jur de 80 g i s-a administrat zilnic, timp de 2—3 săptămîni, cîte 0,1 ml extract apos 20% de *Xanthium* și, respectiv, *Mentha* per os (prin canulă). După perioada de administrare, animalele au fost sacrificate și s-au preparat mitocondriile hepatice și omogenatul renal. În ambele situații s-a determinat consumul de oxigen manometric (metoda Warburg) și P_i

Tabela 2

Efectul extractului apos de *Xanthium spinosum* L. şi *Mentha piperita* L. asupra consumului de oxigen şi fosfat anorganic (P_i) pe mitocondriile de ficat de şobolan în prezenţă de substrate exogene, *in vitro*

Condiţii de experimentare	Substanţe exogene	AO/mg proteine	gP_i/mg proteine
Martori	succinat	9,97	15,8
Xanthium: 0,2 ml/probă	succinat	7,65	25,3
Mentha: 0,1 ml/probă	succinat	9,03	25,5
Mentha: 0,2 ml/probă	succinat	4,50	30,2
Martori	oxoglutarat	6,13	16,4
Xanthium: 0,2 ml/probă	oxoglutarat	4,99	24,6
Mentha: 0,1 ml /probă	oxoglutarat	3,80	27,9
Mentha: 0,2 ml/probă	oxoglutarat	3,04	28,6
Martori	piruvat	7,60	14,5
Xanthium: 0,2 ml/probă	piruvat	3,13	25,3
Mentha: 0,1 ml/probă	piruvat	7,40	28,6
Mentha: 0,2 ml/probă	piruvat	4,40	32,5

Tabela 3

Efectul extractului apos de *Xanthium spinosum* L. şi *Mentha piperita* L. asupra consumului de oxigen şi P_i pe mitocondrii hepatice şi omogenat renal, *in vivo*

Condiţii de experimentare	Substrat exogen	AO/mg proteine	gP_i/mg proteine
Pe mitocondrii hepatice			
Martori	succinat	9,97	15,80
Xanthium	succinat	3,50	17,67
Mentha	succinat	4,90	24,00
Martori	oxoglutarat	6,13	16,40
Xanthium	oxoglutarat	4,60	23,50
Mentha	oxoglutarat	3,15	25,00
Martori	piruvat	7,60	14,50
Xanthium	piruvat	2,05	23,50
Mentha	piruvat	3,03	28,00
Pe omogenat renal			
Martori	endogen	0,12	0,08
Xanthium	endogen	0,06	0,24
Mentha	endogen	0,08	0,36
Martori	succinat	0,265	0,245
Xanthium	succinat	0,24	0,27
Mentha	succinat	0,18	0,28
Martori	oxoglutarat	0,24	0,21
Xanthium	oxoglutarat	0,20	0,26
Mentha	oxoglutarat	0,16	0,35
Martori	piruvat	0,195	0,117
Xanthium	piruvat	0,14	0,34
Mentha	piruvat	0,145	0,32

după Lowry-Lopez. Rezultatele, exprimate pe mg proteine, determinate prin metoda Gornall, sînt prezentate în tabelele 2 şi 3.

Din cercetările *in vitro* pe mitocondrii hepatice se desprind următoarele rezultate:

— Efectul inhibitor semnificativ asupra consumului de oxigen în prezenţa extractului de *Xanthium spinosum* L. cu substrat piruvat şi oxoglutarat. Extractul de *Mentha* produce inhibiţia cea mai puternică a C.O. la concentraţia de 0,2 ml/probă în prezenţă de succinat; în concentraţie de 0,1 ml/probă, inhibiţia se manifestă numai în prezenţă de oxoglutarat. Ca urmare a inhibiţiei C.O., apar modificări caracteristice ale consumului de P_i şi, respectiv, în fosforilarea oxidativă.

Cercetările *in vivo* conduc la următoarele observaţii:

— În urma administrării per os apare o inhibare a C.O. pe mitocondriile hepatice în prezenţa celor trei substrate exogene şi, în consecinţă, modificarea proceselor de fosforilare. Pe omogenatul de rinichi se constată o inhibare semnificativă a C.O. şi a fosforilării pe substrat endogen. Modificările sînt mai puţin exprimate în prezenţa substratelor exogene.

Din interpretarea rezultatelor, primele de acest fel din literatură asupra plantei luate în studiu, se poate considera că efectul extractelor de *Xanthium spinosum* L. şi *Mentha piperita* L. implică intervenţia lor în mecanismele de reglare a proceselor biochimice cu punctul de impact la nivelul energogenezei mitocondriale. În acest mod, ele asigură procesele fundamentale ale celulei şi se opun excesului caracteristic proceselor patologice, consumatoare de energie.

CONCLUZII

Din cercetările fito-biochimice efectuate asupra plantei *Xanthium spinosum* L. se desprind următoarele concluzii:

1. Planta *Xanthium spinosum* L. conţine ca principii active derivaţi fenil-propanoici de tipul acidului cafeic şi clorogenic, cvercetol (de natură flavonică), fitosterine, saponine triterpenice nehemolitice, tanin şi ulei volatil.

2. Conţine un flavonoid nou cu Rf = 0,70.

3. Extractul apos de *Xanthium spinosum* L. asigură procesele fundamentale ale celulei şi se opune excesului caracteristic proceselor patologice, consumatoare de energie.

Prezentat la redacţie
la 12 decembrie 1979

I.M.F. Cluj-Napoca,
**Disciplina de biochimie farmaceutică,*
Disciplina de botanică farmaceutică

PHYTO-BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS ON *XANTHIUM SPINOSUM* L.

SUMMARY

Phyto-biochemical studies were performed in order to make qualitative determinations of the chemical composition of *Xanthium spinosum* L. The presence of phenyl-propanoic derivatives of the caffeic and chloro-

genic acids type as well as of flavones, phytosterols, nonhemolytic triterpene saponins, tannins and volatile oils was revealed.

In view of the fact that by biochemical investigations the metabolic processes, which cause and condition the diseases at the cellular level, can now be known, more and more attempts are made to determine the action of drugs, too, and even of plant extracts on subcellular particles.

In order to reevaluate the data that can be gathered by these studies the authors carried out experimental researches on the action of 20% extracts of *Xanthium spinosum* L. and *Mentha piperita* L. at the level of subcell particles prepared by fractioning the liver and renal homogenates obtained from normal rats and rats subject to previous treatment with these extracts.

From the interpretation of the results, the first of this kind reported in the literature, the conclusion can be drawn that the effect of the extracts obtained from *Xanthium* and *Mentha* imply their intervention in the mechanisms regulating the biochemical processes with their impact point at the level of the mitochondrial energogenesis.

This way they ensure the cell fundamental processes and oppose to the excess characteristic of the energy consuming pathological processes.

BIBLIOGRAFIE

1. AL. BORZA, *Dicţionar etnobotanic*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1968, p. 187.
2. P. DORVAULT, *L'officine ou répertoire générale de pharmacie pratique*, Vigot Frères, Paris, 1923, p. 917, 1472.
3. T. A. GEISMAN, J. amer. chem. Soc., **76**, 685 (1954).
4. T. A. GEISMAN, J. amer. chem. Soc., **79**, 3778 (1957).
5. T. A. GEISMAN, J. org. Chem., **27**, 2692 (1962).
6 R. HÄNSEL, L. HÖRRHAMER, Arch. Pharm., **287**, 189 (1954).
7. R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 3, Birkhäuser Verlag, Basel—Stuttgart, 1964, p. 466, 496.
8. *** *Farmacopeea română*, ed. IX, Bucureşti, 1976, p. 819.
9. T. GOINA, E. CONSTANTINESCU, I. CIULEI, G. RACZ, E. GRIGORESCU, P. PETCU, *Farmacognozie*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1967, p. 150—153, 176—186.
10. F. BERGER, *Handbuch der Drogenkunde*, Bd. IV, 1954, p. 38—39.
11. C. BODEA, *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I, 1964, p. 386.
12. V. A. BONDIUKOVA, Rastitelnie resursi, **6**, *4*, 595 (1969).
13. P. PETCU, T. GOINA, A. RADU, ECATERINA ANDRONESCU, Clujul medical, *2—3*, 457—464 (1972).
14. *** *Farmacopeea română*, ed. VIII, Bucureşti, 1965, p. 786.

VARIAŢIA IMUNOGLOBULINEI A SECRETOARE (SIgA) ÎN MATERIILE FECALE LA SUGARI ÎN FUNCŢIE DE ALIMENTAŢIE

SONIA SANIELEVICI*, LUCIA BUZILĂ, ELENA GANEA, ARINA MINEI*, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. Prin întrebuinţarea metodei de imunodifuzie, s-au stabilit valorile normale de SIgA în materiile fecale la 3 loturi de sugari şi copii mici în funcţie de alimentaţie şi starea fizică, obţinîndu-se următoarele valori medii, exprimate pe un gram de materii fecale: 0,68 mg/g la sugarii eutrofici între 2 şi 10 zile, alimentaţi natural, şi 0,34 mg/g la sugarii distrofici de aceleaşi vîrste; sugarii eutrofici de 1—5 luni alimentaţi natural prezintă de asemenea o valoare ridicată, de 0,78 mg/g.

Copiii de 2—5 luni alimentaţi artificial prezintă o medie de 0,26 mg/g. La aproximativ 70% dintre copiii internaţi cu sindroame grave de malnutriţie, secundare unor diarei cronice de diverse etiologii, se găsesc valori în jur de 0,30 mg/g, necorelate cu valorile IgA serice, indicînd deficite imunologice „cîştigate" prin modificări majore la nivelul mucoasei digestive. Paralelismul dintre valorile foarte scăzute ale SIgA şi ale IgA serice la unii copii indică probabil un deficit selectiv primar în IgA.

Rezultatele sînt corelate cu datele din literatură, ajungîndu-se la concluzia că determinarea SIgA în materiile fecale la sugari şi la copilul mic poate aduce contribuţii în stabilirea atît a aportului de SIgA din colostru şi lapte de mamă în tractul digestiv, cît şi în starea mucoasei digestive.

Laptele uman conferă o semnificativă protecţie contra infecţiilor enterice la copii (1), (2). El poate reduce de asemenea infecţiile neonatale produse de bacteriile gram negative (3).

Această protecţie poate fi mediată de mai multe componente din lapte, cea mai importantă dintre ele fiind imunoglobulina A secretoare (SIgA) (4), (5), (6), (7). Aceasta posedă multiple proprietăţi de anticorpi prin infecţiile repetate ale mamei (8). Anticorpii ingeraţi prin lapte matern nu sînt absorbiţi din intestin la om (9), ci sînt excretaţi ca coproanticorpi activi serologic (10), (11), după ce au fost eficienţi la nivelul tractului intestinal.

În lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim prezenţa SIgA în materiile fecale ale sugarilor dependent atît de alimentaţia lor, cît şi de starea tractului intestinal, în scopul de a încerca să stabilim un indice al capacităţii de apărare a SIgA la nivelul mucoasei intestinale.

Prin aceste determinări se poate aprecia de asemenea aportul de SIgA din colostru şi laptele de mamă, putîndu-se corela cu prezenţa SIgA în scaun.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea extractelor din materiile fecale s-a făcut după Ganea şi Motaş (12): 1 g materii fecale s-a extras cu 1 ml apă distilată, după care s-a agitat şi s-a centrifugat la rece 20 min la 4000 rpm. În supernatantul obţinut s-a făcut determinarea SIgA din punct de vedere cantitativ.

Determinarea cantitativă a SIgA s-a realizat prin dubla difuzie radială în gel, după Mancini şi colab. (13), utilizîndu-se serul anti-SIgA. Concentraţia dintre antiser şi gel a fost

de 1/20. S-a utilizat tamponul fosfat 0,2 M în NaCl fiziologic şi azidă. Citirile s-au făcut pe o curbă martor realizată cu SIgA pur.

Prepararea imunoglobulinei A secretoare s-a efectuat din colostru uman după metoda lui Newcomb (14), modificată de Mestecky (15).

Prepararea serului imun antiimunoglobulina A secretoare s-a făcut pe iepuri. Administrarea antigenului (SIgA) a avut loc în două reprize a cîte 10 injecţii intradermice. La o repriză s-au injectat 2 mg SIgA în 0,5 ml ser fiziologic cu 0,5 ml adjuvant Freund complet Calbiochem. Intervalul dintre cele două reprize a fost de 2 săptămîni. La 10 zile de la ultima injecţie, animalele s-au sîngerat din ureche pentru proba existenţei anticorpilor şi apoi au fost sîngerate total pentru recoltarea serului. Antiserul astfel obţinut a fost păstrat îngheţat în frigider pînă la utilizarea lui.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-au luat în studiu trei loturi de sugari.

Lotul A a fost compus dintr-un număr de 15 nou-născuţi între 2 şi 10 zile, alimentaţi exclusiv natural. Dintre aceştia, 10 erau eutrofici, cu greutăţi la naştere ce variau între 3000 şi 4950 g, iar 5 prezentau o distrofie de gr. I, cu greutăţi la naştere ce variau între 2500 şi 2900 g.

Valorile SIgA în scaun la lotul eutrofic sînt destul de strînse, variind între 0,50 pînă la 0,80 mg/g, cu o medie de 0,68 mg/g, foarte apropiată de valorile individuale.

Tabela 1

Valorile SIgA din materiile fecale ale copiilor în vîrstă de 2—10 zile alimentaţi natural, exprimate în mg/g

Numele şi prenumele	Vîrstă (zile)	Sex	Greutate naştere (g)	SIgA
M. R.	2	F	3 900	0,70
D. Gh.	3	M	3 800	0,75
S. M.	4	M	3 100	0,67
M. M.	4	F	4 950	0,80
M. R.	6	M	3 800	0,50
S. A.	6	F	3 250	0,72
I. S.	7	M	3 850	0,58
G. I.	8	M	4 100	0,63
O. M.	8	F	3 250	0,60
B. R.	10	M	3 000	0,80
Media				0,68
Distrofie gr. I				
S. T.	2	F	2 800	0,20
T. M.	3	F	2 700	0,35
S. I.	5	F	2 900	0,30
A. D.	5	F	2 600	0,37
N. A.	9	F	2 500	0,46
Media				**0,34**

Nou-născuții prematuri hrăniți tot natural prezintă o excepție, avînd valori scăzute de SIgA, care variază între 0,20 pînă la 0,46 mg/g, cu o medie de 0,34 mg/g.

Valorile ridicate ale SIgA în scaunele nou-născuților la termen alimentați natural provin aproape exclusiv din aport exogen, colostrul

Tabela 2

Valorile SIgA din materiile fecale ale copiilor în vîrstă de 1—5 luni alimentați naturali, exprimate în mg/g

Numele și prenumele	Vîrstă (luni)	Sex	Greutate naștere (g)	SIgA
		Eutrofici		
Z. Z.	1	M	3 000	0,60
D. D.	2	M	2 900	0,80
F. R.	2	F	3 600	0,38
C. E.	3	M	3 750	0,94
D. M.	4	F	3 650	0,80
P. A.	5	F	2 800	0,94
S. E.	5	M	4 050	0,94
S. T.	5	M	2 900	0,80
Media				0,78

matern, știut fiind că în primele săptămîni de viață sistemul imunologic local intestinal încă nu a intrat în funcție (16).

Valorile de SIgA rămîn crescute în scaunul sugarilor alimentați natural și în primele luni (1—5 luni) (tabela 2), explicîndu-se astfel starea de sănătate a acestora mai ales în ceea ce privește îmbolnăvirile prin afecțiuni digestive (17), (18).

Ca o concluzie logică, deci, la studiul acestui lot reiese importanța alimentației naturale nu numai pe plan nutrițional, dar și pe plan imunologic, demonstrată prin prezența valorilor ridicate de SIgA în scaunul sugarilor alimentați natural.

Lotul B a constat dintr-un număr de 5 sugari de vîrste variind între 2 și 5 luni, alimentați artificial la domiciliu (toți sugarii beneficiau de condiții bune de mediu, alimentație corectă și îngrijiri corespunzătoare).

Tabela 3

Valorile SIgA din materiile fecale ale copiilor în vîrstă de 2—5 luni alimentați artificial, exprimate în mg/g

Numele și prenumele	Vîrstă (luni)	Sex	Greutate naștere (g)	SIgA
P. R.	4	M	3 900	0,28
L.A.-M.	3	M	3 200	0,32
T. M.	5	F	3 050	0,38
C. L.	$2^1/_2$	F	2 500	0,22
P. C.	$3^1/_2$	F	900	0,14
Media				0,26

Valorile SIgA în scaun sînt semnificativ mai scăzute decît în primul lot (media 0,26 mg/g), cele mai reduse valori prezentîndu-le 2 sugari născuţi prematur (0,14 şi, respectiv, 0,22 mg/g). Deşi cazuistica noastră este redusă, reiese evident că alimentaţia artificială se soldează cu valori scăzute de SIgA în scaun, fapt semnalat şi de Lodinova şi colab. (19). Din studiul nostru se evidenţiază deci explicaţia ştiinţifică a frecvenţei crescute semnificativ statistic a îmbolnăvirilor în sfera digestivă a sugarilor alimentaţi artificial. Trecerea nejustificată la alimentaţia artificială, aşa cum s-a efectuat în ultimele decenii pe plan mondial, poate fi considerată ca una din marile greşeli ale pediatriei actuale, explicînd în bună măsură apariţia unei patologii digestive şi nutriţionale extrem de grave.

Lotul C a cuprins un număr de 29 de sugari şi copii pînă la vîrsta de 21 de luni, internaţi cu sindroame grave de malnutriţie secundare unor diarei cronice de etiologie diversă. Paralel cu dozările SIgA în scaun s-au efectuat şi determinările imunoglobulinelor serice la Institutul „Dr. V. Babeş".

Din tabela 4 reies valorile extrem de scăzute, sub 0,30 mg/g, la aproximativ 70% din cazuri, corelîndu-se cu starea clinică a pacientului. Dacă valorile IgA serice variază între 43 şi 90 U.I., cu trei excepţii (de două ori 9 şi o dată 22 U.I.), valorile SIgA nu urmează valorile IgA serice decît la aceste excepţii (0,10 şi, respectiv, 0,14 mg/g). Aceste excepţii se încadrează probabil în disgamaglobulinemii primare prin deficit selectiv de IgA, în majoritatea cazurilor fiind vorba de deficite imunologice „cîştigate".

Dar sînt şi valori destul de ridicate (0,43—0,63 mg/g) care nu se mai corelează cu starea pacientului. În aceste cazuri nu este exclus ca modificarea mucoasei intestinale să antreneze o pierdere mai rapidă a SIgA de pe mucoasă, exprimată prin creşterea acesteia prin fecale (9), (20).

De obicei, deficitul seric în IgA merge paralel cu deficitul de la nivelul mucoaselor (9), (20), pe cînd deficitul local nu se corelează de cele mai multe ori cu prezenţa IgA în ser, care poate prezenta în acest caz valori în limite normale (21).

Analiza lotului prezentat conduce la concluzia că diareile cronice cu sindroame de malnutriţie grave prezintă în marea lor majoritate deficite de SIgA în scaun, explicîndu-se astfel frecvenţa îmbolnăvirilor şi gravitatea cazurilor cu evoluţia lor defavorabilă şi trenantă. Pe de altă parte, unele diarei cronice grave cu malnutriţie secundară, intractabile la terapia obişnuită, se datoresc unor deficite imune primare (IgA seric şi SIgA la nivelul mucoasei digestive).

Rezultatele noastre indică comparativ valorile SIgA la nivelul intestinului la un moment dat în decursul alimentaţiei naturale sau artificiale sau în decursul unor diarei trenante intractabile. Ele nu exprimă raportul dintre cantitatea ingerată şi cea eliminată, un studiu de acest gen fiind făcut de către Ogra şi colab. (16), indicînd o eliminare prin materiile fecale de aproximativ 65% a SIgA din colostru administrat în primele 12—72 de ore de la naştere. De reţinut însă că eliminarea singurei prize administrate se face în decurs de 72 de ore, SIgA avînd un timp destul de îndelungat de a-şi exercita rolul protector la nivelul mucoasei (16).

Tabela 4

Valorile SIgA din fecalele copiilor între 3 și 21 de luni, pacienți la Spitalul „Gr. Alexandrescu", diagnosticați cu malnutriție, diarei trenante

Numele și prenumele	Vîrstă (luni)	Sex	Greutate naștere (g)	Greutatea intern. (g)	Greutate extern. (g)	IgAS (mg)	IgA serică	Zile spital
C. L.	3	M	2 430	4 000	4 500	0,14	90	37
G. L.	4	F	4 250	4 200	5 100	0,24	90	57
D. M.	5	F	2 600	4 350	4 780	0,54	90	34
S. C.	8	F	5 000	7 000	7 500	0,47	90	23
P. M.	9	F	2 300	6 200	6 750	0,63	94	36
P. A.	4	F	2 900	4 100	5 200	0,12	80	43
M. A.	4	F	3 150	3 200	4 400	0,34	70	32
D. L.	5	M	2 900	4 100	4 800	0,20	70	40
M. D.	6	M	2 700	5 900	6 345	0,63	74	40
P. A.	7	M	3 500	7 500	8 400	0,36	70	35
A. Gh.	9	M	3 000	7 300	8 400	0,16	70	26
I. I.	9	M	2 950	7 100	8 700	0,18	63	36
B. E.	9	F	2 900	8 000	8 800	0,18	62	82
A. P.	1 an și 6 luni	M	2 800	9 000	9 200	0,40	74	20
P. C.	1 an și 8 luni	F	3 450	8 830	8 900	0,40	60	98
S. I.	1 an și 9 luni	M	3 200	7 600	9 800	0,22	63	36
A. I.	5	M	4 800	6 000	6 400	0,24	49	47
G. I.	5	M	3 200	3 600	4 800	0,38	45	37
D. M.	3	F	3 100	2 600	4 000	0,12	47	35
I. M.	7	M	2 875	7 000	7 800	0,24	62	56
V. T.	7	F	2 800	6 800	7 500	0,23	54	192
E. D.	8	M	3 600	7 150	8 300	0,14	43	53
P. D.	8	M	3 250	7 150	7 900	0,14	63	36
D. A.	8	F	2 450	5 020	5 350	0,48	45	108
P. P.	6	M	3 100	7 300	8 200	0,60	43	34
L. E.	3	M	3 100	2 900	4 100	0,14	22	40
S. C.	4	M	2 800	4 000	5 000	0,10	9	59
S. Gh.	6	M	2 750	5 200	6 050	0,10	9	38
I. G.	3	M	3 000	2 500	3 500	0,53	90	58
Media						0,30		

În concluzie, se poate aprecia că, prin determinarea SIgA în materiile fecale la sugar și copilul mic, se pot stabili atît aportul de SIgA din colostru și lapte de mamă în tractul digestiv, cît și capacitatea de apărare a SIgA la nivelul mucoasei intestinale.

Prezentat la redacție
la 10 decembrie 1980

Institutul de științe biologice, București,
Laboratorul de imunochimie
și
**Institutul medico-farmaceutic, București,*
Catedra de pediatrie,
Spitalul de copii „Grigore Alexandrescu"

VARIATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A (SIgA) IN THE FAECES OF BREAST-AND FORMULA-FED NEWBORN INFANTS DEPENDENT ON NUTRITION

SUMMARY

The normal values of SIgA in faeces of three groups of sucklings and babies depending on nutrition and the condition of health were determined by the immunodiffusion technique and the following mean values were obtained expressed per 1 g of faeces:
0.68 mg/g for breast fed eutrophic newborn infants 2—10 days old, and 0.34 mg/g in dystrophic breast fed newborn infants respectively, at the same age.

The eutrophic breast fed newborn infants 1—5 months old also show a high value of 0.78 mg/g.

The formula-fed newborn infants 2—5 months old exhibit a mean value of 0.26 mg/g.

70 per cent of the newborn infants admitted into hospital with severe malnutrition syndrome secondary to some chronical diarrhoea of various etiology had a value of around 0.30 mg/g for SIgA, value which has no bearing on the serum IgA level. These results suggest an immunological deficiency "acquired" following gross alterations in the intestinal mucosa. The low level of faeces SIgA and serum IgA in some cases suggests an IgA primary selective deficiency.

The results are discussed in relation to the available published data and we strongly feel that the determination of SIgA in faeces of sucklings and babies may prove an important tool for the assessment of the ingested human colostrum and milk SIgA and as an index checking the normal or pathological state of the digestive mucosa.

BIBLIOGRAFIE

1. L. J. MATA, J. J. URRATIA, Ann. N. Y. Acad. Sci., **176,** 63 (1971).
2. E. S. FUBARA, R. FRETER, J. Immunol., **111,** 395 (1973).
3. J. WINBERG, G. WESSNER, Lancet, **1,** 1091 (1971).
4. J. W. GERRARD, Pediatrics, **54,** 757 (1974).
5. A. S. GOLDMAN, W. C. SMITH, J. Pediat., **82,** 1082 (1973).
6. L. A. HANSON, J. WINBERG, Arch. Dis. Child., **47,** 845 (1972).
7. L. K. WELSH, J. T. MAY, J. Pediat., **93,** 1 (1979).
8. L. GOTHEFORS, B. CARLSSON, S. AHLSTEDT, L. A. HANSON, J. WINBERG, Acta paediat. scand., **65,** 225 (1976).
9. T. B. TOMASI, H. M. GRAY, Progr. Allergy, **16,** 81 (1972).
10. J. J. GINDRAT, L. GOTHEFORS, L. A. HANSON, J. WINBERG, Acta paediat. scand., **61,** 587 (1972).
11. J. F. KENNY, M. I. BOESMAN, R. H. MICHAELS, Pediatrics, **39,** 202 (1967).
12. E. GANEA, C. MOTAŞ, St. cerc. biochim., **22,** 149 (1979).
13. G. MANCINI, A. CARBONARA, J. F. HEREMANS, Immunochemistry, **2,** 235 (1965).
14. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101,** 905(1968).
15. J. MESTECKY, R. KULHAVY, F. W. KRAUS, J. Immunol., **108,** 788 (1972).
16. S. S. OGRA, D. WEINTRAUB, P. L. OGRA, J. Immunol., **119,** 245 (1977).
17. B. CARLSSON, S. AHLSTEDT, L. A. HANSON, G. LIDIN—JANSON, B. S. LINDBLAD, R. SULTANA, Acta paediat. scand., **65,** 417 (1976).
18. R. A. GUNN, A. M. KIMBALL, R. A. POLLARD, J. C. FEELEY, R. A. FELDMAN, S. R. DUTTA, P. P. MATTHEW, R. A. MAHMOOD, Lancet, **1,** 730 (1979).
19. R. LODINOVA, V. JOUJA, V. WAGNER, Pediat. Res., **7,** 659 (1973).
20. W. R. BROWN, D. BUTTERFIELD, D. SAVAGE, T. TATA, Gut, **13,** 441 (1972).
21. B. CARLSSON, L. GOTHEFORS, S. AHLSTEDT, L. A. HANSON, J. WINBERG, Acta paediat. scand., **65,** 216 (1976).

OBŢINEREA ŞI CARACTERIZAREA α-CHIMOTRIPSINEI IMOBILIZATE PE DERIVAŢI AI AGAROZEI

H. D. SCHELL, A. WAHEED, DANIELA BĂNĂŢEANU, MARIA RABEGA, T. BENŢIA

Rezumat. Preparatele enzimatice insolubile obţinute prin imobilizarea α-chimotripsinei pe CH-Sepharose 4 B şi agaroză reticulată şi activată cu BrCN sînt catalitic active, nu-şi modifică pH-ul optim de acţiune faţă de enzima liberă şi sînt mai stabile faţă de variaţii de pH şi de temperaturi mai ridicate. Activitatea proteolitică reziduală variază în funcţie de suport şi de cantitatea de enzimă cuplată şi ajunge în cazul derivatului obţinut cu agaroză activată cu BrCN pînă la 60%. Activitatea esterazică este considerabil mai crescută şi se situează, în funcţie de substratul folosit, între 80 şi 96% faţă de enzima liberă. Valoarea constantei Michaelis ap ı entă (K'_m) la α-chimotripsina legată de agaroză activată cu BrCN este mai mică pentru cazeină şi BTEE, egală pentru BAEE şi mai mare faţă de ATEE, în comparaţie cu enzima liberă.

α-Chimotripsina (α-Cht) (EC 3.4.4.5) este o enzimă proteolitică izolată de obicei din pancreasul bovinelor. Ea hidrolizează cu mare uşurinţă legăturile peptidice, amidice şi esterazice date de gruparea carboxil a radicalilor aminoacizilor : tirozină, triptofan şi fenilalanină, dar şi legăturile peptidice la care participă carboxilul radicalilor leucil, metionil, asparaginil şi glutamil. Această enzimă se caracterizează, între altele, printr-o acţiune puternic antiinflamatorie şi grăbeşte vindecarea ţesuturilor rănite sau lovite dacă este injectată persoanelor traumatizate.

Obţinerea de preparate de α-Cht imobilizată cu activitate enzimatică reziduală ridicată prezintă un interes deosebit şi aceasta atît pentru proprietăţile noi care apar în urma imobilizării enzimei prin legare covalentă de un suport insolubil, cît şi pentru variatele perspective de aplicare în practică a enzimei sub formă imobilizată. Astfel, se ştie că prin imobilizare enzimele devin în general mai termostabile şi mai puţin sensibile la variaţii de pH ale mediului de reacţie şi la acţiunea inhibitorilor, iar proteazele rezistente la degradarea autolitică. În stare imobilizată, enzimele pot fi folosite de repetate ori fie în coloane enzimatice, fie în sistem batch şi în orice moment pot fi uşor şi complet îndepărtate din mediul de reacţie prin simplă filtrare sau centrifugare. Dintre domeniile de aplicare ale α-Cht imobilizate se pot aminti mai ales hidroliza parţială şi controlată a proteinelor în cadrul analizelor de structură, hidroliza stereospecifică a esterilor unor acizi organici în vederea separării izomerilor dextrogiri de cei levogiri dintr-un amestec racemic, folosirea ca suport afin în cromatografia de afinitate pentru izolarea inhibitorilor ei naturali din diferite surse animale şi vegetale.

Pînă în prezent au fost obţinute deja o serie de preparate de α-Cht imobilizată cu activităţi enzimatice reziduale mai modeste sau mai bune, folosindu-se o gamă variată de metode şi suporturi insolubile în acest

St. cerc. biochim., 24, 1, 97–107 (1981)

scop. Dintre metodele folosite la imobilizarea α-Cht se pot aminti cele bazate pe adsorbţia enzimei de un suport solid de tipul caolinitei (1), (2), legarea ionică a enzimei de derivaţi ai celulozei (3), apoi copolimerizarea cu diferite combinaţii organice (4), (5), (6), (7), includerea în gel de poliacrilamidă (8), reticularea cu glutaraldehidă (9), (10) şi, în sfîrşit, cele bazate pe legarea covalentă a enzimei de substanţe organice macromoleculare polihidroxilice, cum sînt celuloza (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), dextranul (18), (19), (20), (21), agaroza (22), (23), (24), (25), care trebuie în prealabil însă activată prin una din metodele descrise în literatura de specialitate în acest scop, pentru a putea reacţiona cu molecula enzimei.

În lucrarea de faţă prezentăm rezultatele obţinute la imobilizarea α-Cht prin legarea ei covalentă de CH-Sepharose 4 B şi de un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN, precum şi unele proprietăţi caracteristice ale preparatelor imobilizate pe α-Cht.

Comportarea α-Cht imobilizată faţă de o serie de inhibitori, precum şi ca suport afin în cromatografia de afinitate la izolarea inhibitorilor ei naturali din diferite surse biologice va forma obiectul unor lucrări viitoare.

MATERIAL ŞI METODE

În cercetările noastre am folosit un preparat liofilizat de α-Cht din pancreas bovin (Biofarm, Bucureşti), iar ca suport pentru imobilizare atît CH-Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suedia), cît şi un gel perlat de agaroză reticulată, preparată în laboratorul nostru (26) şi activată cu BrCN. Carbodiimida solubilă (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă — EDC), necesară legării covalente a enzimei de CH-Sepharose 4 B, a fost procurată de la Firma Serva Feinbiochemica (Heidelberg, R. F. Germania), iar BrCN pentru activarea agarozei de la Firma Merck — Schuchardt (Hohenbrunn, R. F. Germania). Substratele utilizate în determinările noastre au avut următoarea proveniență: cazeina Hammarsten de la Firma Fluka AG (Buchs, Elveţia), iar ATEE, BTEE şi BAEE de la Firma Sigma, Chemical Company (S.U.A.).

Cuplarea α-Cht de CH-Sepharose 4 B. S-au introdus 2 g CH-Sepharose 4 B în 25 ml soluţie NaCl 0,5 M şi s-a lăsat pentru umflare timp de 2—3 ore la temperatura camerei, după care s-a spălat cu apă distilată pe o pîlnie filtrantă, la trompa de apă. Cei 9 ml gel rezultaţi s-au tratat apoi cu 15 mg α-Cht dizolvată în 5 ml apă distilată şi cu 100 mg EDC dizolvate în 2 ml apă distilată. S-a ajustat pH-ul amestecului de reacţie la 4,5—6,0 şi s-a lăsat peste noapte la temperatura camerei. A doua zi s-a filtrat la trompă, păstrîndu-se o parte din supernatant pentru dozarea spectrofotometrică a enzimei nelegate, şi s-a spălat gelul enzimatic de mai multe ori alternativ cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate.

Variind raportul dintre gelul activat şi α-Cht folosită în reacţie, s-au obţinut geluri enzimatice cu un conţinut variabil de enzimă/ml gel.

Cuplarea α-Cht de agaroză reticulată şi activată cu BrCN. 10 ml gel perlat de agaroză reticulată cu epiclorhidrină (concentraţia gelului 6 %) s-au activat, în condiţiile indicate de Axén şi colab. (19), cu 200 mg BrCN. Gelul proaspăt activat a fost tratat apoi cu 15 mg α-Cht dizolvate în 6 ml soluţie de $NaHCO_3$ 0,1 M şi s-a lăsat într-o capsulă acoperită peste noapte, la temperatura camerei. A doua zi s-a filtrat la trompă, păstrîndu-se o parte din supernatant pentru dozarea enzimei nelegate, şi s-a spălat gelul enzimatic alternativ de mai multe ori cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M, pentru îndepărtarea completă a enzimei care nu s-a legat de suportul insolubil.

Determinarea cantităţii de enzimă legată covalent de gelul agarozei s-a efectuat prin spectrofotometrarea soluţiei enzimatice la 280 nm, înainte şi după reacţia de cuplare, folosindu-se un spectrofotometru tip VSU-2 PC Zeiss (Jena, R. D. Germană).

Determinarea activității proteolitice a enzimei libere și imobilizate s-a făcut după metoda indicată de Kunitz (27) pentru tripsină și modificată pentru α-Cht (28), utilizîndu-se ca substrat cazeina Hammarsten. În acest scop s-a preparat mai întîi o soluție de cazeină 1% în tampon borat 0,1 M, pH 8,0, care conține și 1,1 ml soluție $CaCl_2$ 5%. Reacția enzimatică propriu-zisă a fost efectuată după cum urmează: în eprubete care conțineau 1 ml soluție de substrat cu cazeină adus la 37°C, s-au adăugat 0,5 ml de α-Cht, 0,0025% în HCl 0,001 M în cazul enzimei libere sau 0,1 ml gel enzimatic în cazul enzimei imobilizate. S-au completat probele cu 0,5 ml și, respectiv, 0,9 ml soluție de tampon borat la un volum total de 2 ml și s-au incubat timp de 20 min la 37°C, agitînd din cînd în cînd. Reacția enzimatică a fost apoi stopată în cazul enzimei libere prin adăugarea a 3 ml soluție de acid tricloracetic 5%, iar în cazul enzimei imobilizate prin filtrare, adăugîndu-se în filtratele obținute de asemenea cîte 3 ml soluție de acid tricloracetic. După agitarea probelor și după un repaus de 20 min la temperatura camerei s-au determinat compușii de hidroliză rezultați prin spectrofotometrare la 280 nm. Extincțiile citite au fost transformate cu ajutorul unei curbe etalon în μmoli tirozină. Activitatea proteolitică s-a exprimat în μmoli tirozină/min/mg enzimă.

Determinarea influenței pH-ului asupra activității proteolitice a enzimei libere și imobilizate s-a realizat folosindu-se în amestecul de reacție valori de pH situate la 6, 7, 8, 9, 10, 11 și 11,5 și procedîndu-se în rest ca mai sus.

Determinarea stabilității termice a enzimei libere și imobilizate. În vederea evidențierii unor eventuale modificări apărute în termostabilitatea α-Cht în urma legării ei covalente de suporturile insolubile, s-au preincubat paralel atît enzima liberă cît și cele două preparate de enzimă imobilizate timp de 60 min la următoarele temperaturi: 0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 și 100°C. Probele au fost apoi aduse la 37°C și folosite la determinarea activității proteolitice în condițiile arătate.

Determinarea activității proteolitice a enzimei libere și imobilizate în funcție de temperatura de reacție. S-a lucrat în condițiile arătate, folosindu-se însă, în loc de 37°C, următoarele temperaturi de incubare: 0, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 și 100°C.

Variația activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate în funcție de concentrația ei s-a urmărit folosindu-se în mediul de reacție cantități crescînde de enzimă, cuprinse în cazul enzimei libere între 5 și 20 μg, adică 0,1 — 1,0 ml dintr-o soluție 0,0025%, și în cazul enzimei imobilizate între 10 și 75 μg, ceea ce corespunde unui volum de gel cuprins între 0,1 și 1,0 ml.

Determinarea constantei Michaelis pentru α-Cht liberă și imobilizată prin legarea ei covalentă de agaroză activată cu BrCN. S-a determinat K_m atît pentru un substrat macromolecular natural, cum este cazeina, cît și pentru trei substrate sintetice cu greutate moleculară mică, cum sînt esterul etilic al N-acetil-L-tirozinei (ATEE), esterul etilic al N-benzoil-L-tirozinei (BTEE) și clorhidratul esterului etilic al α-N-benzoil-L-argininei (BAEE).

În vederea determinării constantei Michaelis a enzimei libere și imobilizate pentru cazeină s-au folosit în mediul de reacție soluții de cazeină cu concentrații de 5, 10, 15, 20, 25 și 30g‰, determinîndu-se activitatea proteolitică în condițiile arătate mai înainte. Prezentînd grafic reciprocele vitezelor de reacție în funcție de reciprocele concentrațiilor de substrat, conform metodei indicate de Lineweaver-Burk, se obțin valorile corespunzătoare pentru constanta Michaelis a enzimei libere (K_m) și constanta Michaelis aparentă (K'_m) a enzimei imobilizate.

Pentru determinarea constantei Michaelis a enzimei libere și imobilizate față de ATEE am folosit metoda indicată de Schwert și Takenaka (29), procedînd în cazul enzimei libere după cum urmează: într-o cuvă de cuarț s-au introdus probe de cîte 3 ml soluție de ATEE cu concentrații de 1,55, 3,11, 4,67, 6,22, 7,78 și 9,34 mM în tampon fosfat 0,067 M, pH 7,0, care au fost tratate cu cîte 0,1 ml soluție α-Cht 0,044%; extincția s-a citit în momentul adăugării enzimei și exact după 5 min la 237 nm și 25°C față de un martor care conținea, în locul soluției de enzimă, un volum egal de HCl 0,001 N. Prin hidroliza legăturii esterice a substratului a avut loc o scădere a absorbției. Rezultatele au fost exprimate în unități/mg și calculate după următoarea formulă:

$$\text{unități/mg} = \frac{\Delta A_{237}/\text{min} \times 5}{0{,}0075 \times \text{mg enzimă în probă}},$$

unde ΔA_{237} este scăderea absorbției la 237 nm în decurs de 5 min la 25°C.

În cazul enzimei imobilizate s-a adăugat, în locul soluției de enzimă liberă, 0,1 ml suspensie de gel care conținea 0,05 ml gel enzimatic, extincția probei citindu-se înaintea adăugării gelului și după 5 min de reacție, după ce gelul a fost mai întîi separat prin filtrare.

La determinarea constantei Michaelis a celor două preparate de enzimă faţă de BTEE am ţinut seama de indicaţiile date de Hummel (30), procedînd în cazul enzimei libere după cum urmează: într-o cuvă de cuarţ s-a pipetat mai întîi 1,4 ml soluţie de BTEE în metanol 50% de diferite concentraţii (0,31, 0,46, 0,62, 0,77, 0,93 şi 107 mM), realizate în soluţie tampon Tris-HCl 0,08 M, pH 7,8; apoi s-a adăugat cîte 1,5 ml soluţie tampon Tris-HCl cu $CaCl_2$ 0,1 M şi, în sfîrşit, 0,1 ml soluţie de α-Cht 0,011%, extincţia citindu-se la 256 nm şi 25°C în momentul adăugării soluţiei de enzimă şi după exact 5 min faţă de un martor care, în locul enzimei, conţinea 0.1 ml HCl 0,001 N. În cazul enzimei imobilizate s-a procedat ca în exemplul anterior. Prin hidroliza legăturii esterice s-a produs în acest caz o scădere a absorbţiei. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unităţi/mg şi s-a calculat după formula:

$$\text{unităţi/mg} = \frac{\Delta A_{256}/\text{min} \times 5 \times 1000}{964 \times \text{mg enzimă în probă}},$$

unde ΔA_{256} este scăderea absorbţiei la 256 nm şi 25°C.

În sfîrşit, am determinat constanta Michaelis a celor două preparate de enzimă şi faţă de un al treilea ester, BAEE, care este de fapt un substrat folosit mai ales pentru tripsină. În acest scop am ţinut seama de asemenea de indicaţiile date de Schwert şi Takenaka (29), procedînd în cazul enzimei libere după cum urmează: în cuvă de cuarţ s-au pipetat 3 ml soluţie BAEE de diferite concentraţii (0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 şi 0,30 mM) în tampon fosfat 0,067 M, pH 7,6 şi 0,1 ml soluţie de α-Cht 0,044% în HCl 0,001 N, extincţia citindu-se la 253 nm imediat după adăugarea enzimei şi după 5 min de reacţie la 25°C faţă de un martor care, în locul soluţiei de enzimă, conţinea 0,1 ml HCl 0,001 N. În cazul enzimei legate s-a adăugat 0,1 ml suspensie de gel enzimatic, extincţia probei citindu-se la 253 nm înaintea adăugării gelului şi la 5 min după ce s-a îndepărtat mai întîi gelul din amestecul de reacţie prin filtrare. Prin hidroliza legăturii esterice a substratului a avut loc o creştere a absorbţiei. Activitatea esterazică s-a calculat în acest caz din relaţia:

$$\text{unităţi/mg} = \frac{\Delta A_{253}/\text{min} \times 5}{0{,}003 \times \text{mg enzimă în probă}}$$

Din datele experimentale obţinute s-a calculat apoi K_m după metoda lui Lineweaver-Burk.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Preparatul enzimatic insolubil rezultat prin legarea covalentă a α-Cht de CH-Sepharose 4 B are un conţinut proteic de 0,97 mg/ml gel, ceea ce corespunde la 40 mg/g produs uscat sau la un conţinut în enzimă de 4%. Această valoare concordă foarte bine cu cele indicate în literatura de specialitate pentru preparate similare. Astfel, conţinutul în enzimă al preparatului obţinut de Sundberg şi Porath (22) prin imobilizarea α-Cht pe un derivat oxiranic al agarozei este de 50 mg/g produs uscat, iar preparatele comerciale de enzime imobilizate livrate de diferite firme (Miles-Seravac, Merck) au un conţinut de enzimă cuprins între 1 şi 10%. Activitatea proteolitică reziduală a acestui preparat este însă relativ mică, dar este totuşi dublă faţă de valoarea de 4% a produsului obţinut pe un derivat al Sephadexului (12) sau a celui obţinut prin includerea α-Cht într-un gel de poliacrilamidă care are o activitate reziduală de 4,5% (9).

O activitate proteolitică reziduală considerabil mai mare se constată, în schimb, la preparatul obţinut prin imobilizarea α-Cht pe agaroză reticulată şi activată cu BrCN. În acest caz, activitatea enzimei imobilizate poate atinge, după cum rezultă şi din tabela 1, pînă la 60% din activitatea enzimei libere. Valori similare (între 56 şi 62%) au fost semnalate doar în cazul preparatelor obţinute pe unii derivaţi ai celulozei (11).

Din tabela 1 rezultă totodată că activitatea proteolitică, adică acțiunea enzimei asupra unor substrate macromoleculare, variază invers proporțional cu conținutul în enzimă al preparatului enzimatic insolubil, fapt semnalat și de alți autori (31). Această comportare se poate explica prin

Tabela 1

Variația activității proteolitice a α-Cht imobilizate prin legarea ei covalentă de gel perlat de agaroză reticulată și activată cu BrCN, în funcție de cantitatea enzimei legate de gel

Proba	Conținutul proteic al gelului (mg enzimă/ml gel)	Activitatea proteolitică reziduală (%)
1	0,92	11
2	0,88	25
3	0,79	33
4	0,58	60

intervenția unor factori sterici, care la un moment dat, cînd moleculele enzimei încep să se aglomereze prea mult pe suprafața suportului insolubil, se repercutează negativ asupra activității catalitice, îngreuind accesul substratului la situsurile active ale moleculelor de enzimă imobilizată.

Tot intervenției unor factori sterici se datorește și diferența relativ mare care se observă între activitatea catalitică a α-Cht imobilizate față de un substrat macromolecular (activitate proteolitică), pe de o parte, și cea față de un substrat cu o greutate moleculară joasă (activitate esterazică), pe de altă parte. La preparatul de α-Cht imobilizată cu activitate proteolitică de 60% se constată astfel o activitate esterazică de 80% în cazul ATEE, de 82% în cazul BAEE și chiar de 96% cînd se folosește ca substrat BTEE. Diferența dintre aceste două tipuri de activități catalitice se observă și la preparatele cu o activitate proteolitică reziduală mai mică. Astfel, preparatul α-Cht corespunzător unei activități proteolitice de 25% prezintă o activitate esterazică de 40%, folosind ca substrat ATEE. O comportare similară a fost observată și de alți autori atît în cazul α-Cht (18), (31), (32), cît și în cazul altor proteaze, ca, de pildă, la tripsină (33), (34), (35), (36) sau papaină (37), (38), (39).

Determinînd variația activității proteolitice a celor două preparate de enzimă imobilizate, se constată că α-Cht nu-și modifică pH-ul optim de acțiune în urma legării ei covalente de suportul insolubil (fig. 1). Se observă totodată o comportare practic identică a celor două preparate imobilizate și o creștere a stabilității acestora față de variațiile de pH în comparație cu enzima liberă. Astfel, în timp ce enzima liberă mai prezintă la pH 10 doar 25% din activitatea ei inițială, cea imobilizată păstrează în aceste condiții o activitate de 50%, respectiv 55%. La pH 11,0, cînd enzima liberă și-a pierdut complet activitatea proteolitică, cea imobilizată mai prezintă încă 12% și, respectiv, 17% din activitatea ei inițială. La pH 11,5, și preparatele imobilizate își pierd activitatea. O creștere a

stabilităţii faţă de variaţii de pH în urma imobilizării am putut constata şi în cazul altor enzime imobilizate, ca, de pildă, la β-amilază (40), aldolază (41) şi altele.

Prin imobilizare creşte şi termostabilitatea α-Cht. Probele de α-Cht liberă şi imobilizată ţinute timp de 60 min la temperaturi cuprinse între 0 şi 100°C şi aduse apoi la 37°C pentru determinarea activităţii proteolitice prezintă în cazul enzimei libere la temperaturi de incubare mai ridicate activităţi simţitor mai scăzute în comparaţie cu probele care conţin preparatele imobilizate (fig. 2). Astfel, în timp ce enzima liberă îşi pierde peste 50% din activitatea iniţială după o preincubare timp de 60 min la 45°C, preparatele enzimei imobilizate mai păstrează în aceste condiţii încă 75% şi, respectiv, 80% din activitatea lor iniţială. La o preincubare la 75°C, cînd enzima liberă mai prezintă doar un rest de activitate de 10%, preparatele imobilizate mai posedă activităţi de 36% şi, respectiv, 40%. După o preincubare la 85°C, α-Cht îşi pierde complet activitatea proteolitică, condiţie în care preparatele imobilizate mai prezintă o activitate de 18% şi, respectiv, 27% din activitatea lor iniţială. Şi în acest caz se observă o comportare foarte asemănătoare între cele două preparate de α-Cht imobilizată. Termostabilitatea mai mult sau mai puţin pronunţată este de asemenea o proprietate nouă pe care o dobîndesc enzimele în urma imobilizării şi a fost observată şi de alţi autori (9), (42) în cazul α-Cht imobilizate.

În figura 3 se redă influenţa temperaturii de reacţie asupra activităţii proteolitice a celor trei preparate de enzimă. Preparatele analizate prezintă toate aceeaşi temperatură optimă de reacţie, situată la 55°C.

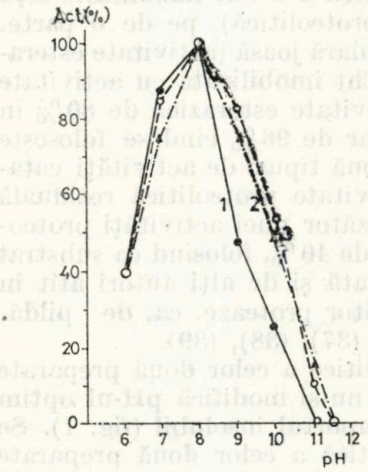


Fig. 1. — Variaţia activităţii proteolitice în funcţie de pH-ul mediului de reacţie la α-Cht liberă (*1*) şi imobilizată pe CH-Sepharose 4 B (*2*) şi pe agaroză activată cu BrCN (*3*).

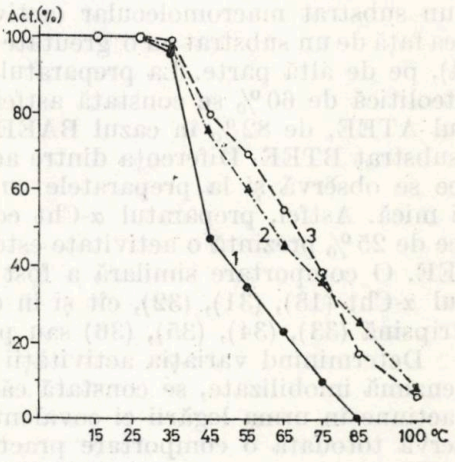


Fig. 2. — Influenţa temperaturii de preincubare asupra activităţii proteolitice a α-Cht libere (*1*) şi imobilizate pe CH-Sepharose 4 B (*2*) şi pe agaroză activată cu BrCN (*3*). Activităţile proteolitice au fost determinate după o păstrare prealabilă a celor trei preparate enzimatice timp de 60 min la temperaturile indicate în figură.

Se constată totodată și o comportare asemănătoare a celor trei preparate la temperaturile situate sub temperatura optimă de reacție. La temperaturi mai mari, cele două preparate imobilizate se comportă asemănător și în acest caz, prezentînd însă, în comparație cu enzima liberă, întotdeauna activități proteolitice mai mari. Așa, de exemplu, ele prezintă la o tempe-

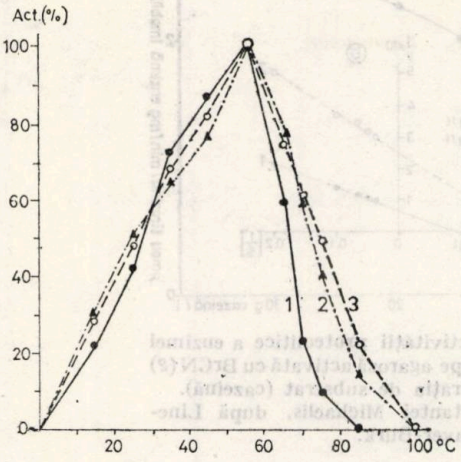


Fig. 3. — Influența temperaturii de reacție asupra activității proteolitice a enzimei libere (*1*) și imobilizate pe CH-Sepharose 4 B (*2*) și pe agaroză activată cu BrCN (*3*).

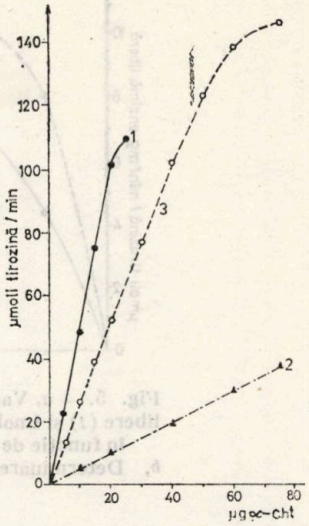


Fig. 4. — Variația activității proteolitice în funcție de cantitatea de enzimă folosită în mediul de reacție: *1*, α-Cht liberă; *2*, α-Cht imobilizată pe CH-Sepharose 4 B; *3*, α-Cht imobilizată pe agaroză activată cu BrCN.

ratură de reacție de 70°C o activitate enzimatică în jur de 60% din cea optimă, în timp ce enzima liberă mai păstrează la această temperatură doar 22% din activitatea ei. Chiar la o temperatură de 85°C, cînd enzima liberă și-a pierdut complet activitatea proteolitică, enzima imobilizată păstrează încă o activitate de 15% și, respectiv, 23% din cea inițială.

În figura 4 se prezintă variația activității proteolitice a α-Cht libere și imobilizate în funcție de concentrația ei în mediul de reacție. La toate cele trei preparate se observă o creștere liniară a activității proteolitice în funcție de concentrația enzimei, care la preparatele mai active (enzima liberă și enzima imobilizată pe agaroză activată cu BrCN) prezintă, începînd cu o anumită concentrație, o tendință de curbare, fenomen cunoscut la enzime care acționează asupra substratelor macromoleculare.

Determinînd constantele Michaelis aparente ale α-Cht imobilizate pe agaroză reticulată și activată cu BrCN față de diferite substrate naturale și sintetice, cum sînt cazeina și o serie de esteri organici, după metoda Lineweaver-Burk (fig. 5—8), se constată o comportare diferită a enzimei

legate faţă de cea liberă în funcţie de substratul folosit. Astfel, în timp ce în cazul cazeinei α-Cht imobilizată îşi micşorează K_m de la 11,2 la 5,0 g cazeină/l (fig. 5), iar în cazul BTEE de la 2,6 la 1,5 mM (fig. 6),

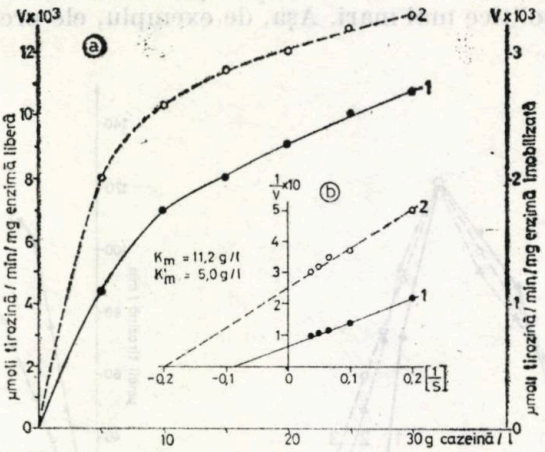


Fig. 5. — *a*, Variaţia activităţii proteolitice a enzimei libere (*1*) şi imobilizate pe agaroză activată cu BrCN (*2*) în funcţie de concentraţia de substrat (cazeină). *b*, Determinarea constantei Michaelis, după Lineweaver-Burk.

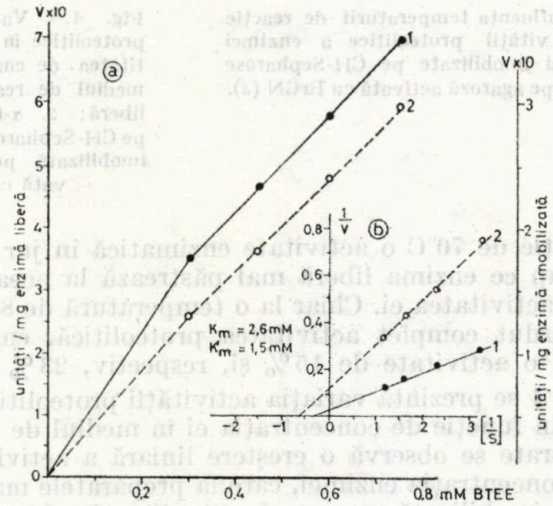


Fig. 6. — *a*, Variaţia activităţii esterazice a enzimei libere (*1*) şi imobilizate pe agaroză activată cu BrCN (*2*) în funcţie de concentraţia de BTEE. *b*, Determinarea constantei Michaelis, după Lineweaver-Burk.

la ATEE această constantă se măreşte de la 3,3 mM la enzima liberă la 25 mM în cazul celei legate (fig. 7). Menţionăm că valori similare au fost găsite în cazul ATEE şi de Axén şi colab. (21) atît la α-Cht liberă, cît şi

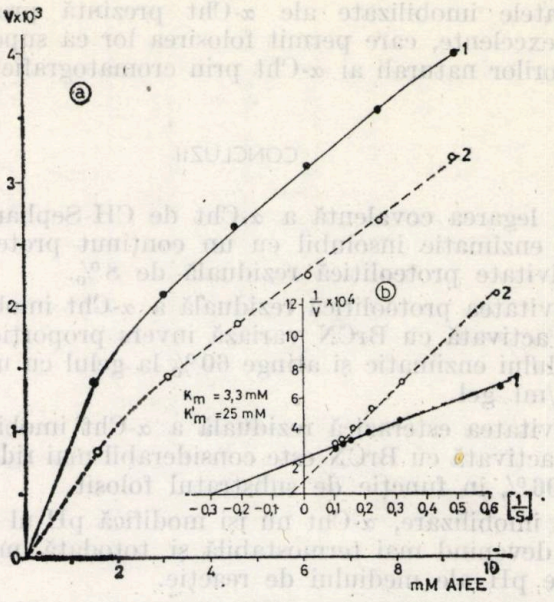


Fig. 7. — *a*, Variația activității esterazice a enzimei libere (*1*) și imobilizate pe agaroză activată cu BrCN (*2*) în funcție de concentrația de substrat (ATEE). *b*, Determinarea constantei Michaelis, după Lineweaver—Burk.

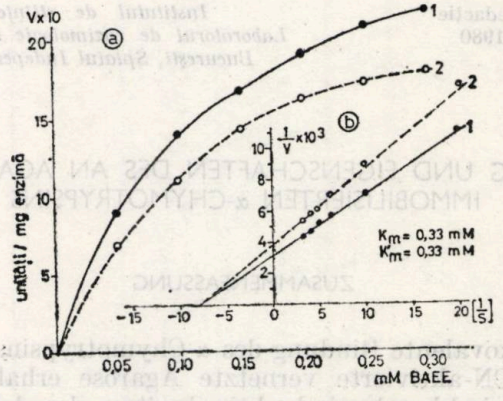


Fig. 8. — *a*, Variația activității esterazice a enzimei libere (*1*) și imobilizate prin legare covalentă de agaroză activată cu BrCN (*2*) în funcție de concentrația de BAEE.
b, Determinarea constantei Michaelis, după Lineweaver—Burk.

la cea legată de Sephadex G-200. În cazul BAEE, care este de fapt un substrat specific pentru tripsină, valoarea constantei Michaelis nu se modifică în urma imobilizării α-Cht, fiind în ambele cazuri de 0,33 mM (fig. 8).

Preparatele imobilizate ale α-Cht prezintă proprietăţi mecanice şi catalitice excelente, care permit folosirea lor ca suporturi afine în izolarea inhibitorilor naturali ai α-Cht prin cromatografie de afinitate.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a α-Cht de CH-Sepharose 4 B se obţine un preparat enzimatic insolubil cu un conţinut proteic de 0,97 mg/ml gel şi o activitate proteolitică reziduală de 8%.

2. Activitatea proteolitică reziduală a α-Cht imobilizate pe agaroză reticulată şi activată cu BrCN variază invers proporţional cu conţinutul proteic al gelului enzimatic şi atinge 60% la gelul cu un conţinut proteic de 0,58 mg/ml gel.

3. Activitatea esterazică reziduală a α-Cht imobilizate pe agaroză reticulată şi activată cu BrCN este considerabil mai ridicată, fiind situată între 80 şi 96% în funcţie de substratul folosit.

4. Prin imobilizare, α-Cht nu îşi modifică pH-ul optim de acţiune proteolitică, devenind mai termostabilă şi totodată mai puţin sensibilă la variaţii de pH ale mediului de reacţie.

5. În urma imobilizării α-Cht pe agaroză reticulată şi activată cu BrCN se observă o micşorare a constantei Michaelis faţă de substratele cazeină şi BTEE şi o mărire a acesteia în cazul ATEE. Faţă de BAEE, α-Cht nu îşi modifică K_m prin imobilizare în comparaţie cu enzima liberă.

Prezentat la redacţie
la 24 aprilie 1980

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de enzimologie şi biostimulatori,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DES AN AGAROSEDERIVATE IMMOBILISIERTEN α-CHYMOTRYPSINS

ZUSAMMENFASSUNG

Die durch kovalente Bindung des α-Chymotrypsins an CH-Sepharose 4 B und an BrCN-aktivierte vernetzte Agarose erhaltenen unlöslichen Enzympräparate sind katalystisch aktiv, besitzen das gleiche pH-Optimum, wie das freie Enzym und sind beständiger gegenüber Schwankungen des pH-Wertes und erhöhten Temperaturen. Die proteolytische Restaktivität hängt von der an das Gel gebundenen Enzymmenge ab und erreicht im Falle des an BrCN-aktivierte Agarose gebundenen α-Chymotrypsins 60%. Die Esteraseaktivität ist bedeutend höher und liegt, je nach dem verwendeten Substrat, zwischen 80 und 96%. Die scheinbare Michaelis-Konstante (K'_m) des trägergebundenen α-Chymotrypsins ist im Falle des Caseins und des BTEE kleiner, gegenüber dem ATEE grösser und bleibt im Falle des BAEE unverändert im Vergleich zum freien Enzym.

BIBLIOGRAFIE

1. A. D. McLAREN, E. F. ESTERMANN, Arch. Biochem. Biophys., **61**, 158 (1956).
2. A. D. McLAREN, E. F. ESTERMANN, Arch. Biochem. Biophys., **68**, 157 (1957).
3. M. A. MITZ, R. F. SCHLUETER, J. amer. chem. Soc., **81**, 4024 (1959).
4. T. WAGNER, C. F. HSU, C. KELLEHER, Biochem. J., **108**, 892 (1968).
5. E. B. ONG, Y. TSANG, E. G. PERLMANN, J. biol. Chem., **241**, 5661 (1966).
6. R. P. PATEL, D. V. LOPIEKES, S. P. BROWN, S. PRICE, Biopolymers, **5**, 577 (1967).
7. L. GOLDSTEIN, Biochemistry, **11**, 4072 (1972).
8. P. BERNFELD, J. WAN, Science, **142**, 678 (1963).
9. G. BROWN, S. AVRAMEAS, E. SÉLEGRY, D. THOMAS, Biochim. biophys. Acta, **185**, 260 (1969).
10. S. AVRAMEAS, T. TERNYNCK, J. biol. Chem., **242**, 651 (1967).
11. G. KAY, E. M. CROOK, Nature, **216**, 514 (1967).
12. G. KAY, M. D. LILLY, Biochim. biophys. Acta, **198**, 276 (1970).
13. G. KAY, M. D. LILLY, A. K. SHARP, R. F. H. WILSON, Nature, **217**, 641 (1968).
14. S. AVRAMEAS, T. TERNYNCK, Immunochemistry, **6**, 53 (1969).
15. M. D. LILLY, C. MONEY, W. HORNBY, E. M. CROOK, Biochem. J., **95**, 45 (1965).
16. M. A. MITZ, L. J. SUMMARIA, Nature, **189**, 579 (1961).
17. N. WELIKY, H. H. WEETALL, Immunochemistry, **2**, 293 (1965).
18. R. AXÉN, J. PORATH, Nature, **210**, 367 (1966).
19. R. AXÉN, J. PORATH, S. ERNBACK, Nature, **214**, 1302 (1967).
20. R. AXÉN, S. ERNBACK, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).
21. R. AXÉN, P. Å. MYRIN, J. C. JANSON, Biopolymers, **9**, 401 (1970).
22. L. SUNDBERG, J. PORATH, J. Chromatogr., **90**, 87 (1974).
23. Y. HAYASCHI, W. B. LAWSON, J. biol. Chem., **244**, 4158 (1969).
24. J. BRAND, L. O. ANDERSSON, J. PORATH, Biochim. biophys. Acta, **386**, 196 (1975).
25. J. CARLSON, R. AXÉN, T. UNGE, Eur. J. Biochem., **59**, 567 (1975).
26. H. D. SCHELL, T. BENTIA, M. A. MATEESCU, Brevet românesc nr. 65382/1977.
27. M. KUNITZ, J. gen. Physiol., **30**, 291 (1947), în *Methods in enzymology*, sub red. S. P. COLOWICK și N. O. KAPLAN, Academic Press, Inc., New York, 1955, vol. II, p. 19.
28. W. RICK, în *Methods of enzymatic analysis*, sub red. M. U. BERGMEYER, Academic Press, New York, 1965, p. 800.
29. G. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. biophys. Acta, **16**, 570 (1955).
30. P. C. W. HUMMEL, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
31. M. L. GREEN, G. CRUTCHFIELD, Biochem. J., **115**, 183 (1969).
32. J. PORATH, R. AXÉN, S. ERNBACK, Nature, **215**, 1491 (1967).
33. M. D. LILLY, C. MONEY, W. HORNBY, E. M. CROOK, Biochem. J., **94**, 45P (1965).
34. A. BAR-ELI, E. KATCHALSKI, J. biol. Chem., **238**, 1690 (1963).
35. A. BAR-ELI, E. KATCHALSKI, Nature, **188**, 856 (1960).
36. R. HAYNES, K. A. WALSH, Biochim. biophys. Res. Commun., **36**, 235 (1969).
37. A. N. GLAZER, A. BAR-ELI, E. KATCHALSKI, J. biol. Chem., **237**, 1832 (1962).
38. J. J. CEBRA, D. GIVOL, I. H. SILMAN, E. KATCHALSKI, J. biol. Chem., **236**, 1720 (1961).
39. I. H. SILMAN, M. ALBU-WEISSENBERG, E. KATCHALSKI, Biopolymers, **4**, 441 (1966).
40. H. D. SCHELL, I. CORNOIU, M. A. MATEESCU, Rev. roum. Biochim., **11**, 199 (1979).
41. H. D. SCHELL, L. SCOLNIC, M. CÂRSTEANU, St. cerc. biochim., **20**, 77 (1977).
42. *** *Enzite, Insolubilized Enzymes*, prospect editat de Miles—Seravac (Pty) Ltd., Anglia, **2**, 8 (1970).

ÎNLOCUIREA SULFATULUI DE LITIU DIN IMPORT NECESAR ÎN REACTIVUL FOLIN-CIOCÂLTEU CU SĂRURI DE LITIU INDIGENE

M. ZAMFIR, VL. GHEORDUNESCU

Rezumat. Sulfatul de litiu necesar preparării reactivului Folin-Ciocâlteu a fost înlocuit prin sulfat de litiu preparat din clorură de litiu indigenă şi prin clorură de litiu ca atare. În ambele situaţii, reactivul s-a dovedit de aceeaşi calitate cu cel preparat din sulfat de litiu Serva. Totodată s-a precizat importanţa ionului de litiu.

Cu toate inconvenientele sale, determinarea concentraţiei proteice prin metoda Lowry (1) este foarte des utilizată, mai ales în varianta Miller (2). Prepararea reactivului Folin-Ciocâlteu, în afară de faptul că este destul de laborioasă, necesită, printre alte substanţe, sulfatul de litiu, substanţă din import greu accesibilă.

Pentru acest motiv ne-am propus înlocuirea sulfatului de litiu prin clorură de litiu (de provenienţă indigenă) sau prin sulfat de litiu obţinut de noi din aceasta şi acid sulfuric. De asemenea, printr-o verificare suplimentară a identităţii de structură a heteropoliacidului, care prin reducere se colorează în albastru, am utilizat amestecul în părţi egale al reactivului preparat cu sulfat de litiu Serva, cu sulfat de litiu preparat din substanţe indigene şi cu clorură de litiu. Pe de altă parte, am avut în vedere intervalul larg de concentraţii proteice care, în multe experienţe, urmează să fie determinate. Aceasta necesită o metodă sensibilă, caracterizată în acelaşi timp de un domeniu de proporţionalitate densitate optică/concentraţie cît mai mare, excluzîndu-se astfel, pe cît posibil, diluările. Se ştie că proporţionalitatea se respectă la valori mici ale concentraţiei şi densităţii optice.

Din aceste motive, curbele de calibrare cu albumină serică bovină s-au trasat pe intervalele de concentraţie 50—500 μg/ml şi 50—300 μg/ml, în primul caz citindu-se la 540 nm, iar în al doilea la 750 nm. Densităţile optice ale compuşilor peptidici consideraţi au fost determinate pentru concentraţiile de 75 şi 500 μg/ml.

MATERIALE ŞI METODE

Pentru prepararea reactivului Folin-Ciocâlteu s-au folosit următoarele substanţe: H_3PO_4 BDH (d=1,84), HCl conc. (Reactivul), Li_2SO_4 (Serva), LiCl (Reactivul), Na_2WO_4 (Merck), Na_2MoO_4 (Merck), Br_2 (Merck). Compuşii folosiţi pentru testarea diferitelor tipuri de reactivi Folin-Ciocâlteu au fost, în ordine, albumină serică bovină, fracţiunea V (Calbiochem), pepsină de porc (Merck), tripsină (NBC), penicilinază (NBC), cazeinat de sodiu (Serva), cazeină

solubilă (BDH), casaminoacids (Difco), casein hydrolysate (Chinoin), bactopeptonă (Difco), sulfat de protamină (NBC), penicilină G (F. A. Iaşi) şi glicil-glicină (Merck). Dintre acestea, albumina serică bovină a fost întrebuinţată şi pentru obţinerea curbelor de densitate optică în funcţie de concentraţie. Citirile densităţilor optice s-au făcut la un Spekol.

Din fiecare compus s-au preparat două concentraţii: 75 μg/ml şi 500 μg/ml, iar la albumina serică bovină s-au preparat soluţii conţinînd între 25 şi 500 μg/ml pentru trasarea curbelor. Reactivul Folin-Ciocâlteu a fost preparat în modul cunoscut (1), cu excepţia adaosului de sulfat de litiu, pentru care s-au adoptat trei variante: a) varianta clasică, folosindu-se sulfat de litiu (Serva), b) cu sulfat de litiu obţinut prin calcinarea la nişă a cantităţii echivalente de clorură de litiu cu un mic exces de acid sulfuric concentrat, c) cu cantitatea echivalentă de clorură de litiu în locul sulfatului de litiu.

Reactivul Folin-Ciocâlteu în cele trei variante a fost diluat de 110 ori cu apă; în aceste soluţii s-au determinat valorile de pH rezultate, s-au luat volume alicote de cîte 10 ml şi s-au titrat cu NaOH 1 n, pînă la pH 9,0. Reactivul preparat cu sulfat de litiu Serva a fost considerat în această situaţie criteriul de comparaţie. Cele trei variante de reactiv au fost amestecate în volume egale şi, în acest fel, au servit unor determinări suplimentare ale concentraţiei aceloraşi compuşi peptidici. În toate cazurile, după tratarea probelor conform tehnicii Lowry—Miller (1), (2) s-a lăsat să se dezvolte culoarea 10 min la 52°C (în baie de apă termostatată).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Credem că adaosul de sulfat de litiu în reactivul Folin-Ciocâlteu „clasic" are rolul de a înlătura turbiditatea, care apare în urma reacţiei compusului fosfomolibdenic-fosfowolframic, deja existent în reactivul Folin-Ciocâlteu, cu Na^+, existent de asemenea în reactiv, cu K^+ din reactivul Miller (care este, de fapt, un reactiv biuret modificat şi reprezintă prima etapă din cele două principale ale reacţiei Lowry) şi cu alţi cationi existenţi în majoritatea probelor supuse determinării proteinei. Această presupunere se întemeiază pe proprietatea fosfomolibdaţilor şi a fosfowolframaţilor de a fi folosiţi ca schimbători de ioni cu mare capacitate de fixare pentru metalele alcaline, alcalino-pămîntoase şi de altă natură (inclusiv, de exemplu, Tl^+) (3), (4). Cationul Li^+, cu volum propriu mult mai mic şi în concentraţie mult mai mare, formează, prin competiţie pentru anionul complex, compuşi similari, dar solubili (3), (4). În acest fel se realizează ca întreaga cantitate de fosfomolibdowolframat să fie disponibilă pentru reacţia redox.

Compuşii peptidici folosiţi de noi (tabela 1) au structuri foarte diverse. În toate cazurile însă se constată valori foarte apropiate între densităţile optice obţinute la cele două lungimi de undă, cînd s-au folosit cele patru tipuri de reactiv Folin-Ciocâlteu. În general, valorile mai puţin concordante se datoresc reactivului cu sulfat de litiu preparat de noi, fiind mai scăzute. Aceasta se poate datora unei insuficiente calcinări, ceea ce conduce la o cantitate mai mare de anioni SO_4^{2-}, cunoscut ca intervenind în formarea heteropoliacizilor din reactiv (3).

În majoritatea cazurilor însă, diferenţele sînt numai la a doua zecimală şi, după părerea noastră, în limita unor erori experimentale minore, inerente complexităţii reacţiei. În tabela 1 se pot observa multe cazuri în care nu există diferenţe între densităţile optice rezultate cu variantele de reactiv menţionate. De altfel, folosirea oricăreia dintre variante nu reclamă identitatea cu celelalte, aşa-zisa eroare faţă de vreuna (după cum se observă, minoră) avînd un caracter sistematic. Recomandăm însă variante cu clorură de litiu, care în majoritatea cazurilor conduce la rezul-

Tabela 1

Variația densității optice la 540 și 750 nm cu compusul peptidic la două concentrații, precum și cu cele patru tipuri de reactiv Folin-Ciocâlteu utilizate

Compusul peptidic	Tipul de reactiv	Lungimea de undă (nm)			
		540		750	
Albumină serică bovină	a	0,20	1,00	0,39	—
	b	0,14	1,00	0,38	—
	c	0,18	1,00	0,35	—
	d	0,19	1,00	0,38	—
Bactopeptonă	a	0,08	0,44	0,22	0,84
	b	0,07	0,43	0,17	0,80
	c	0,09	0,42	0,24	0,82
	d	0,09	0,433	0,24	0,82
Cazeinat de sodiu	a	0,13	0,70	0,30	1,40
	b	0,12	0,70	0,25	1,40
	c	0,12	0,70	0,30	1,40
	d	0,13	0,707	0,32	1,40
Cazeină solubilă	a	0,14	0,83	0,33	1,80
	b	0,12	0,78	0,25	1,75
	c	0,13	0,82	0,32	1,786
	d	0,14	0,823	0,333	1,80
Casein hydrolysate	a	0,09	0,53	0,24	1,00
	b	0,08	0,51	0,17	0,95
	c	0,08	0,513	0,23	1,00
	d	0,08	0,52	0,24	1,00
Casaminoacids	a	0,01	0,06	0,035	0,16
	b	0,01	0,06	0,02	0,12
	c	0,01	0,06	0,04	0,16
	d	0,01	0,06	0,03	0,16
Glicil-glicină	a	0,03	0,04	0,085	0,09
	b	0,0	0,04	0,03	0,07
	c	0,02	0,03	0,07	0,09
	d	0,03	0,03	0,09	0,09
Penicilină G	a	0,13	1,60	0,29	—
	b	0,17	1,60	0,35	—
	c	0,12	1,607	0,30	—
	d	0,13	1,60	0,323	—
Penicilinază	a	0,01	0,015	0,025	0,06
	b	0,01	0,01	0,02	0,04
	c	0,01	0,02	0,02	0,05
	d	0,01	0,02	0,02	0,06
Pepsină	a	0,14	0,77	0,33	—
	b	0,12	0,773	0,26	—
	c	0,12	0,76	0,30	—
	d	0,123	0,767	0,316	—
Sulfat de protamină	a	0,09	0,60	0,22	0,91
	b	0,08	0,58	0,19	0,87
	c	0,08	0,623	0,23	1,10
	d	0,086	0,607	0,243	1,10
Tripsină	a	0,01	0,09	0,04	0,26
	b	0,01	0,08	0,02	0,17
	c	0,01	0,08	0,02	0,25
	d	0,01	0,09	0,03	0,257

Notă: a) cu sulfat de litiu Serva, b) cu sulfat de litiu preparat în laborator, c) cu clorură de litiu, d) amestec în părți egale al celor trei tipuri.

Fiecare valoare reprezintă media a trei determinări practic identice. În coloana din stînga fiecărei lungimi de undă sînt valorile corespunzătoare concentrației de 75 μg/ml, iar în coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă cele corespunzătoare concentrației de 500 μg/ml.

tate identice cu varianta „clasică"; în plus, această substanţă este larg accesibilă, fiind comercializată de „Reactivul".

Pentru trasarea curbei etalon, care în mod obişnuit se realizează cu concentraţii în ordine crescătoare de albumină serică bovină, am recurs de asemenea la cele patru tipuri de reactiv Folin-Ciocâlteu (tabela 2), la cele două lungimi de undă menţionate. După cum se observă, valorile densităţilor obţinute sînt extrem de apropiate, practic identice pentru reactivul preparat cu sulfat de litiu Serva şi cel preparat cu clorură de litiu „Reactivul" şi de asemenea cu amestecul în părţi egale al celor trei tipuri de reactivi. Din această cauză, cele trei curbe de etalonare se confundă (fig. 1 şi 2).

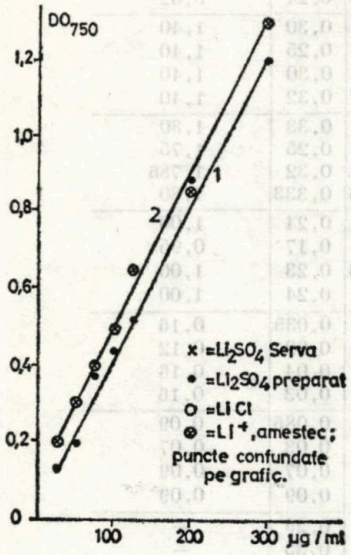


Fig. 1. — Variaţia densităţii optice la 750 nm cu concentraţia de albumină serică bovină pentru reactivul Folin—Ciocâlteu preparat: *1*, cu sulfat de litiu obţinut în laborator; *2*, prin amestecul celor trei tipuri de reactivi.

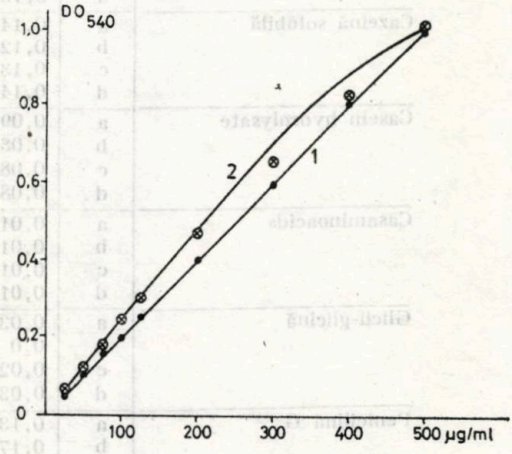


Fig. 2. — Variaţia densităţii optice la 540 nm cu concentraţia de albumină serică bovină pentru reactivul Folin—Ciocâlteu preparat; *1*, cu sulfat de litiu obţinut în laborator; *2*, prin amestecul celor trei tipuri de reactivi.

Valori puţin mai mici, dar suficient de distincte se obţin, pentru citirile la ambele lungimi de undă, în cazul reactivului preparat cu sulfat de litiu din clorură de litiu şi acid sulfuric. Dar şi aici, ca şi în cazul folosirii acestui tip de reactiv la determinarea extincţiei diferiţilor compuşi peptidici, sulfatul de litiu preparat întruneşte, în fond, toate condiţiile de utilizare pentru lungimea de undă de 540 nm. Se remarcă o anume abatere de la liniaritate pentru primele trei tipuri de reactiv, ceea ce reprezintă un inconvenient recunoscut al metodei (1). Este de menţionat că tocmai reactivul obţinut cu sulfat de litiu preparat conduce la o dependenţă liniară între 50 şi 400 µg/ml. Pentru lungimea de undă de 750 nm, am considerat că valorile de extincţie corespunzătoare concentraţiilor mai mari de 300 µg/ml sînt afectate de precizia aparatului de măsură în acest domeniu, astfel încît am renunţat la ele.

Tabela 2

Variația densității optice la 540 și 750 nm cu concentrația de albumină serică bovină în funcție de tipul de reactiv Folin—Ciocâlteu

Concentrația de albumină serică bovină (μg/ml)	Tipul de reactiv	Lungimea de undă (nm)	
		540	750
25	a	0,061	0,193
	b	0,05	0,13
	c	0,06	0,19
	d	0,06	0,19
50	a	0,125	0,30
	b	0,10	0,25
	c	0,12	0,30
	d	0,12	0,30
75	a	0,183	0,40
	b	0,15	0,38
	c	0,175	0,40
	d	0,18	0,40
100	a	0,24	0,50
	b	0,20	0,44
	c	0,24	0,50
	d	0,24	0,50
125	a	0,30	0,65
	b	0,25	0,52
	c	0,30	0,65
	d	0,30	0,65
150	a	0,47	0,85
	b	0,40	0,88
	c	0,48	0,86
	d	0,47	0,85
300	a	0,663	1,30
	b	0,596	1,20
	c	0,676	1,30
	d	0,67	1,30
400	a	0,833	—
	b	0,803	—
	c	0,83	—
	d	0,83	—
500	a	1,006	—
	b	0,993	—
	c	1,0	—
	d	1,0	—

Notă: a) cu sulfat de litiu Serva, b) cu sulfat de litiu preparat în laborator, c) cu clorură de litiu, d) amestec în părți egale al celor trei tipuri.

CONCLUZII

1. S-a arătat că reactivul Folin-Ciocâlteu preparat cu clorură de litiu „Reactivul" şi cu sulfat de litiu preparat în laborator tot din substanţe indigene poate înlocui în condiţii optime reactivul preparat cu sulfat de litiu Serva, atît în determinarea cantitativă a diferiţilor compuşi peptidici, cît şi în construirea curbei de calibrare cu albumină serică bovină.

2. Pentru cele două lungimi de undă alese, frecvent utilizate în domeniul proteinelor prin metoda Lowry, au fost obţinute concordanţe foarte bune, chiar identităţi de valoare, în cazul concentraţiilor (suficient diferite) de 75 μg/ml şi 500 μg/ml (în cazul diferiţilor compuşi peptidici) şi pentru domeniile de concentraţie a albuminei serice bovine de 50—500 μg/ml (540 nm) şi 50—300 μg/ml (750 nm).

3. Reactivul preparat cu clorură de litiu „Reactivul", mai puţin laborios, se dovedeşte identic în utilizarea cu cel preparat cu sulfat de litiu Serva.

4. Valori puţin mai scăzute se observă în cazul reactivului preparat din clorură de litiu şi acid sulfuric, fără însă ca acest lucru să afecteze cu ceva utilizarea lui. El pare chiar indicat în determinările la 540 nm, din cauza liniarităţii obţinute pe domeniul 50—400 μg/ml.

Prezentat la redacţie
la 30 mai 1980

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

THE SUBSTITUTION OF IMPORTED LITHIUM SULPHATE WITH INDIGENOUS LITHIUM SALTS IN THE PREPARATION OF THE FOLIN-CIOCÂLTEU REAGENT

SUMMARY

The lithium sulphate necessary for the preparation of the Folin-Ciocâlteu reagent was substituted by lithium sulphate prepared from lithium chloride (indigenous production) and by lithium chloride as such. In both cases the reagent proved to be of the same quality as the reagent prepared from Serva lithium sulphate. The importance of lithium ion in the composition of this reagent was also explained.

BIBLIOGRAFIE

1. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, H. L. FARR, R. J. RANDALL, J. biol. Chem., **177**, 75 (1951).
2. G. L. MILLER, R. BLUM, E. E. GLENNON, A. L. BURTON, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
3. T. J. WEAKLEY, *Heteropolymolybdates and heteropolytungstates*, în *Structure and bonding*, vol. 18, sub red. J. D. DUNITZ, P. HEMMERICH, R. H. HOLM, J. A. IBERS, C. K. JØRGENSEN, J. B. NEILANDS, D. REINEN, R. J. P. WILLIAMS, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1974, p. 131.
4. T. D. IONESCU, *Schimbători de ioni*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1953, p. 23—24.

VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ

A 4-A SESIUNE ANUALĂ DE COMUNICĂRI ŞTIINŢIFICE A INSTITUTULUI CENTRAL DE BIOLOGIE

A intrat în tradiţia Institutului Central de Biologie ca în fiecare an să aibă loc o sesiune de comunicări ştiinţifice cu ocazia căreia sînt prezentate rezultatele cercetărilor efectuate în laboratoarele institutului.

Între 25 şi 27 septembrie 1980, sesiunea anuală de comunicări ştiinţifice a Institutului Central de Biologie a ajuns la cea de-a 4-a ediţie, constituind o amplă manifestare ştiinţifică la care s-a făcut bilanţul eforturilor conjugate ale tuturor cadrelor institutului.

După o şedinţă festivă de deschidere, prezentarea lucrărilor ştiinţifice înscrise în programul sesiunii s-a făcut pe secţii, reunind contribuţiile cercetătorilor din Bucureşti, Cluj-Napoca şi Iaşi.

Tematica lucrărilor prezentate în cadrul acestei manifestări ştiinţifice a răspuns cerinţelor celor mai stringente ale lumii contemporane, de mare actualitate şi interes ştiinţific: noi surse de materii prime şi de energie, probleme de inginerie genetică bacteriană, implicaţiile biologice ale poluării mediului, obţinerea de noi preparate biochimic active etc.

În cadrul secţiei de biochimie, sesiunea a fost organizată în colaborare cu Comisia de biochimie a Academiei R. S. România.

Lucrările ştiinţifice, prezentate atît în sistem de expunere orală cît şi în sistem poster, s-au încadrat în două tematici generale, răspunzînd atît problematicii de cercetare fundamentală, cît şi celei aplicative: „Mecanisme moleculare de reglare şi control metabolic" şi „Obţinerea de preparate biochimic active".

În cadrul primei teme, lucrările ştiinţifice prezentate au constituit materiale de mare interes teoretic şi aplicativ, reprezentînd o contribuţie valoroasă pentru stabilirea unor noi metodologii terapeutice şi de diagnostic.

Dintre rezultatele mai semnificative, se remarcă separarea şi purificarea unor enzime glicozidazice din surse diferite, a căror antigenicitate a fost redusă prin deglucidizare şi proteoliză limitată, cu păstrarea în mare măsură a activităţii biologice. Investigaţiile de acest gen se impun datorită necesităţii diagnosticării precoce şi terapiei unor enzimopatii.

De un interes deosebit au fost şi cercetările privind dinamica enzimelor proteolitice lizozomale din ţesuturile animalelor de vîrste diferite tratate cu Aslavital, precum şi unele aspecte ale degradării intracelulare a proteinelor dependente de îmbătrînire în tratamentul cu Aslavital. S-a constatat astfel că acest produs, testat pe animale de laborator, restabileşte echilibrul modificat datorită îmbătrînirii, în sensul reactivării enzimelor proteolitice.

Printre lucrările prezentate a solicitat atenţie studiul efectului proteolizei şi deglucidizării imunoglobulinei A secretoare, modificări structurale ce se impun din necesitatea utilizării acestei componente ca factor terapeutic cu acţiune specifică asupra unor agenţi patogeni.

În cadrul metodelor de obţinere a unor preparate biochimic active sînt meritorii preocupările pentru obţinerea, purificarea şi caracterizarea lactazei şi a maltazei din *Aspergillus niger*, reprezentînd un produs cu activitate glicozidazică, proteazică şi amilazică, utilizat ca înlocuitor de enzime la copii cu malabsorbţie prin deficit de lactază.

O preocupare a cercetătorilor secţiei de biochimie a constat în purificarea şi caracterizarea proteazelor extracelulare produse de *Aspergillus oryzae*, enzime importante pentru obţinerea de hidrolizate proteice. Celulazele obţinute din culturile de *Aspergillus niger* au fost caracterizate prin stabilirea influenţei unor cationi asupra activităţii lor.

De asemenea s-au urmărit activităţile β-aspartatkinazei şi catalazei la *Corynebacterium melassecola*, producător de lizină în fază de inocul şi în fermentator. Aceste enzime au fost alese drept parametrii biochimici care să selecteze inoculul ce va produce cantitatea maximă de lizină în fermentator.

De un interes deosebit s-a bucurat preocuparea de a pune la punct tehnici pentru studiul lipozomilor, urmărindu-se includerea β-galactozidazei din *Phaseolus vulgaris* şi evidenţierea învelirii lipozomilor cu imunoglobuline. Utilizarea membranelor artificiale ca lipozomi reprezintă un domeniu nou al cercetării mondiale, rezultatele originale prezentate fiind primele studii de acest gen din ţară.

O noutate în biochimie este obținerea de preparate enzimatice imobilizate catalitic active, rezultînd prin legarea enzimelor de suporturi macromoleculare insolubile. Enzimele imobilizate prezintă avantaje deosebite, remarcîndu-se, printre altele, printr-o rezistență sporită la acțiunea unor parametri fizico-chimici și a unor efectori, ca, de exemplu, ionii unor metale grele ce manifestă o puternică acțiune inhibitoare.

Un suport insolubil derivat de la amiloză reticulată a fost folosit cu succes pentru separarea α-amilazei de β-amilază și de glucoamilază prin cromatografie de afinitate, cu aplicabilitate în chimia clinică și în chimia analitică și preparativă.

Metoda cromatografiei de afinitate a permis și purificarea unor efectori noi descoperiți ai peroxidazei, obținuți din teaca seminței de *Anthyllus vulneraria*. Lucrarea prezintă interes datorită faptului că cei doi efectori naturali, un inhibitor și un activator, nu au mai fost semnalați în literatura de specialitate.

Rezultatele valoroase și originale obținute în laboratoarele secției de biochimie, de interes pentru cercetarea fundamentală și aplicativă, s-au încadrat în tematica planului de cercetare al Institutului Central de Biologie, au făcut obiectul unor contracte de cercetare și s-au concretizat în numeroase lucrări științifice publicate sau în curs de publicare în revistele de specialitate.

Bilanțul rodnic al rezultatelor cercetării originale și de perspectivă prezentate de cercetători în cadrul celei de-a 4-a Sesiuni anuale de comunicări științifice a Institutului Central de Biologie dovedește utilitatea unor astfel de manifestări, care dau posibilitatea unei mai strînse colaborări, a unei conjugări a eforturilor depuse în vederea realizării unei activități științifice de cea mai înaltă calitate.

Daniela Bănățeanu

RECENZII

H. LIPPERT, *SI-Einheiten in der Medizin. Einführung in das Internationale Einheitensystem, Umrechnungstabellen, Normalbereiche* (Unităţi SI în medicină. Introducere în sistemul internaţional de unităţi de măsură, tabele de transformare, domenii de valori normale), prelucrat pentru necesităţile din R.D.G. de H.-J. RADERECHT şi A. GABLER, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1980, 222 pagini

Pentru a preveni, cu ocazia generalizării sistemului internaţional de unităţi de măsură (SI), orice periclitare sau afectare a vieţii şi sănătăţii publice şi pentru a evita interpretări greşite de date analitice sau trecerea lor inexactă în fişele de analize medicale, indicaţii terapeutice, fişe de expertiză sau în normele de protecţie a muncii este imperios necesar să existe de la început un îndreptar care permite transformarea rapidă şi exactă a parametrilor biofizici şi biochimici folosiţi în prezent în noile unităţi cerute de SI. Tocmai acesta este scopul volumului de faţă, care prezintă o ajustare la condiţiile din R. D. Germană a cărţii internaţional recunoscute a lui H. Lippert de la Facultatea de medicină din Hannover (R. F. Germania).

După un scurt capitol introductiv despre evoluţia istorică şi bazele teoretice ale sistemelor de măsură, se prezintă, într-un al doilea capitol, caracteristicile noului sistem internaţional de unităţi de măsură (SI). Partea centrală a cărţii cuprinde tabelele de transformare, în ordinea alfabetică, a parametrilor biofizici şi biochimici, capitol precedat de unul cu indicaţii amănunţite de folosire a tabelelor, exemplu de calcul şi comparaţii între domeniile clasice de referinţă şi cele noi.

Tabelele de transformare ale unităţilor de măsură folosite de obicei şi în prezent în unităţile cerute de SI se aseamănă mult cu tabelele de logaritmi şi sînt foarte uşor de folosit. Interesant de amintit este şi faptul că valorile normale pot fi imediat reperate, fiind tipărite pe un fond gri. Domeniul de valori apropiate de cele normale, dar care sînt încă în discuţie dacă sînt normale sau deja patologice, sînt tipărite pe un fond gri deschis. Fiecare tabelă este însoţită şi de exemple de calcul.

În anexă sînt date masele atomice şi moleculare care au stat la baza alcătuirii tabelelor de transformare, factorii de transformare pentru unele substanţe care nu sînt cuprinse în tabelele amintite şi rezoluţia Conferinţei Mondiale a Sănătăţii WHA 3039 din mai 1977.

Această carte, extrem de utilă atît pentru chimişti, biochimişti şi biologi, cît şi pentru medici din cercetare şi clinică, se încheie cu 84 de indicaţii bibliografice şi un index alfabetic pe subiecte.

Horst D. Schell

K. DOSE, *Biochimie. Eine Einführung* (Biochimie, o introducere), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1980, 308 pagini cu 256 figuri şi 26 tabele

Prezenta introducere în biochimie a rezultat din cursurile ţinute de autor în faţa studenţilor de chimie şi medicină şi ai altor discipline biologice de la Universitatea din Mainz (R. F. Germania). Bazat pe o îndelungată experienţă didactică, autorul a reuşit să prezinte în mod clar şi concis cele mai importante aspecte ale biochimiei, ţinînd seama şi de date mai recente obţinute în această disciplină cuprinsă într-o continuă dezvoltare. Acest manual este util în egală măsură atît celor care învaţă, cît şi celor care predau biochimia în diferite şcoli profesionale sau facultăţi de specialitate (medicină, chimie, biologie, farmacie, agronomie).

După un capitol referitor la legităţile sistemelor biochimice şi evoluţia lor — care cuprinde şi aspecte legate de originea vieţii pe pămînt — şi un capitol consacrat topologiei celulei, autorul tratează rînd pe rînd proprietăţile aminoacizilor şi peptidelor, structura şi proprietăţile proteinelor, enzimelor şi biocataliza, coenzimele şi vitaminele, glucidele şi metabolismul lor, degradarea oxidativă şi sinteza de ATP, apoi lipidele şi metabolismul lor, degradarea proteinelor şi metabolismul aminoacizilor, acizii nucleici şi biosinteza proteinelor şi, în sfîrşit, reglarea şi integrarea metabolismului. Într-o anexă a manualului sînt prezentate o serie de prescurtări folosite în text

și în literatura biochimică, o tabelă cronologică cu cele mai importante descoperiri începînd cu anul 1770 și pînă în prezent, o listă de manuale și tratate de chimie generală și anorganică, chimie organică, biochimie și domenii înrudite și o tabelă cu unități de măsură și factori de transformare. Un index alfabetic pe subiecte încheie în mod util acest manual de biochimie.

Horst D. Schell

U. SPRANGER, *Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten* (Prescurtări din medicină și domenii înrudite), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980, 240 pagini

Folosirea prescurtărilor este cunoscută încă din antichitate, dar a devenit deosebit de răspîndită mai ales în ultimele decenii în urma dezvoltării fără egal a științei și tehnicii. Prescurtările pot fi de un real folos mai ales dacă corespondentul lor neprescurtat reprezintă forme greoaie, deosebit de lungi sau noțiuni complexe.

În volumul de față, autoarea a centralizat un număr de 13 500 de prescurtări utilizate curent în medicină, biochimie, farmacie și tehnica medicală, parcurgînd un număr de 170 000 de pagini de specialitate. Au fost luate în considerare și prescurtările folosite la redarea mărimilor fizice și tehnice și a unităților de măsură cu respectarea unităților de măsură ale sistemului internațional (SI), precum și prescurtările denumirilor unor organizații și societăți.

Autoarea este convinsă că nu a epuizat domeniul și își exprimă în prefață părerea că, datorită creșterii continue a numărului de prescurtări și pentru că unul și același termen are deseori mai multe prescurtări, iar una și aceeași prescurtare poate avea, la rîndul ei, mai multe semnificații, ar fi absolut necesar ca pe viitor să se elaboreze norme în această privință, la care să colaboreze medici și alți specialiști împreună cu lingviști.

După indicații cu privire la modul de folosire a acestei culegeri de prescurtări și indicarea prescurtărilor folosite în text (noțiuni legate de domeniul de folosire a termenilor prescurtați, de limbă, țară sau de gramatică), urmează indexul propriu-zis al prescurtărilor în ordinea alfabetică. Această culegere, care se adresează unui public larg ce activează mai ales în domeniul științelor biologice și medicale, se încheie cu prezentarea unor simboluri și semne folosite în matematică, chimie, fizică și biologie.

Horst D. Schell

Morphogenese der Tiere. Handbuch der ontogenetischen Morphologie und Physiologie in Einzeldarstellungen. Herausgegeben von F. Seidel. Erste Reihe: *Deskriptive Morphogenese.* Lieferung 4: J—I, *Protarthropoda* von O. Pflugfelder (Morfogeneza animalelor. Manual de morfologie și fiziologie ontogenetică în prezentări singulare. Seria întîi: Morfogeneza descriptivă. Livrarea 4: J—I, *Protarthropoda)*, VEB Gustav Fischer—Verlag, Jena, 1980, 121 pagini, cu 97 figuri și 241 prezentări de detalii.

Prezentul volum din seria „Morfogeneza animalelor" este dedicat ontogenezei protoartropodelor *(Onychophora, Tardigrada, Pentastomida)*. Autorul prezintă pentru fiecare grupă în parte poziția sistematică și clasificarea, apoi caracteristicile adulților, modul lor de viață, înmulțirea și perioadele evolutive. Materialul este prezentat concis, într-un limbaj clar și într-o formă foarte sistematizată. De remarcat este marele număr de figuri îngrijit prezentate, care redau scheme evolutive, secțiuni prin diferite organe și țesuturi, imagini complete ale adulților sau ale unor părți anatomice specifice ale acestora, esențiale pentru sistematician. Sînt redate de asemenea și o serie de imagini obținute cu microscopul optic și electronic. Autorul insistă mai ales asupra celulelor germinative, organogenezei, evoluției postembrionare și larvare. Fiecare din cele trei capitole se încheie cu concluzii și indicații bibliografice din literatura de specialitate apărută de la începutul secolului trecut și pînă în zilele noastre.

Prezentul volum, apărut în condiții grafice exemplare, se încheie cu explicarea unor termeni de specialitate, cu un index alfabetic pe autori și un index pe subiecte.

Horst D. Schell

G. BRUSCHKE, *Moderne Alternsforschung* (Studii moderne asupra îmbătrînirii), VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 1979, 180 pagini

Scopul volumului este de a stîrni interesul cititorilor pentru problemele gerontologiei și geriatriei și în același timp de a facilita accesul către lucrări mai ample în aceste domenii.

Aspectele expuse în această lucrare constituie o primă, deși fragmentară, imagine asupra studiului punerii în practică a rezultatelor cercetărilor atît din domeniul biologiei vîrstei înaintate, cît și al încadrării vîrstnicilor în viața activă.

Materialul cuprins în volum este sistematizat în patru părți:

1. Durata de viață și îmbătrînirea în legătură cu mediul înconjurător. În această parte se dezvoltă problemele privind îmbătrînirea fiziologică și patologică, reacțiile dintre îmbătrînire și starea de boală, indicii de îmbătrînire.

2. Teorii asupra cauzelor îmbătrînirii.

3. Drumul către o vîrstă înaintată sănătoasă. Aici își au locul problemele privind alimentația, cultura fizică și sportul, diagnosticul precoce al bolilor, factori ce contribuie la prevenirea îmbătrînirii.

4. O durată de viață mai lungă, sarcină pentru fiecare în parte și pentru societate. Problemele puse în discuție în această ultimă parte a lucrării se referă la alimentație, condițiile de locuit, eforturile fizice la vîrsta înaintată, dacă este necesar sau nu să se continue activitatea și probleme speciale de farmacoterapie la bătrîni.

S. Rădulescu

H. DAVID, G. LEUTERT, *Tiermodelle Menschlicher Krankheisbilder* (Modele pe animal ale bolilor umane), Ergebnisse der experimentallen Medizin, Band 35, Teil I und II, VEB Verlag Volk Und Gesundheit, Berlin, 1980

Cele două volume ale lucrării de față reproduc materialele susținute la Sesiunea Societății de anatomie și patologie a R. D. Germane, care a avut loc în aprilie 1978 la Magdeburg, sub conducerea profesorilor Heinz David și Gerhard Leutert, personalități proeminente în patologia experimentală și celulară.

Lucrarea cuprinde, în 616 pagini, 64 comunicări, împărțite în șase capitole astfel: probleme filozofice și principii ale modelării în medicină și în patologia experimentală; modele experimentale pe animale privind sistemul cardiovascular: modele experimentale ale proceselor imune; modele experimentale pe animale asupra proceselor de dezvoltare normale, regenerative și maligne; procedee de modelare în patologia experimentală; experimente pe animale care simulează maladii specifice umane.

O mare parte a comunicărilor cuprinse în această lucrare sînt ilustrate cu numeroase microfotografii corect executate de pe preparate histologice sau cu fotografii de ultrastructură.

De o atenție specială se bucură unele organe și maladii specifice, între care bolile cardiovasculare, rinichiul și bolile de rinichi, plămînul și variate pneumopatii, tumorile experimentale, diabetul experimental, ciroza hepatică.

Cartea este utilă pentru medici și biologi interesați în patologia umană, veterinară sau experimentală, precum și pentru histopatologi.

C. C. Prunescu

V. S. TURUSOV (sub redacția), *Pathology of tumors in laboratory animals*, vol II: *Tumors of the mouse* (Patologia tumorilor la animalele de laborator, vol. II: Tumorile șoarecelui), IARC Scientific Publication No. 23, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1979

Acest volum, consacrat tumorilor șoarecelui, cuprinde 668 de pagini, în care sînt incluse 824 fotografii de probe macroscopice, histologice și electronooptice. Fotografiile sînt judicios alese și de bună calitate, ilustrînd corect fenomenele tumorale spontane sau experimentale.

În cele 25 de capitole se prezintă tumorile pielii, glandelor mamare, salivare și lacrimale, ale foselor nazale, ale sinusurilor maxilare și ale glandelor Harder, ale cavității bucale, faringelui, esofagului, stomacului, intestinului, peritoneului, ficatului și pancreasului exo- și endocrin. Sînt de asemenea descrise tumorile tractusului respirator, ale rinichiului, pelvisului renal și ureterului, vezicii urinare, testiculului și glandelor accesorii, ale vaginului, uterului și ovarului. Lucrarea continuă cu descrierea tumorilor hipofizei, tiroidei, paratiroidelor și glandelor suprarenale, a tumorilor țesuturilor moi, a tumorilor sistemului hematopoietic, osului, articulațiilor, sistemului nervos central și periferic și se încheie cu un capitol consacrat teratoamelor.

Fiecare capitol cuprinde o introducere cu un scurt istoric, descrierea structurii normale a organului, date de morfologie și biologie a tumorilor, în care se descriu diferitele tipuri de tumori, criteriile de malignitate, creșterea tumorală și metastazele, transplantabilitatea tumorilor; se prezintă date privind apariția tumorilor spontane și inducția tumorilor; capitolul se încheie cu o discuție în care se compară fenomenele oncologice de la șoarece cu cele de la alte specii de animale de laborator și de la om.

Această carte este utilă cercetătorilor și medicilor interesați în patologie comparată, în oncologie experimentală, în histopatologie și biologie celulară.

C. C. Prunescu

BARBARA BROWN GOULD, *Organization of afferents from the brain stem nuclei to the cerebellar cortex in the cat* (Organizarea aferențelor din nucleii de origine ai creierului în cortexul cerebelar la pisică), în *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol. 62, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1980, 90 pagini

Acest volum cuprinde descrierea detaliată a unor cercetări originale privind extinderea trasorilor enzimatici injectați în diferite părți ale cortexului cerebelar și marcarea, cu această metodă, a aferențelor dintre nucleii de origine din creier și cortexul cerebelar.

Materialul folosit constă din 37 pisici adulte tinere, în care, prin înțepături superficiale sau profunde în cortexul cerebelar, s-a injectat peroxidază de hrean înalt purificată. Animalele au fost sacrificate după 4 — 88 ore prin perfuzie transcardială cu soluție de formaldehidă și/sau glutaraldehidă. După secționarea la un microtom de congelare, secțiunile au fost tratate cu diaminobenzidină — apă oxigenată, pentru decelarea zonelor de concentrare a peroxidazei.

Cercetările de față demonstrează că mai mulți nuclei de origine din creier se proiectează în contexul cerebelar decît se considera pînă în prezent. Între aceștia citām un grup de celule din tegmentum rombencefalic, lateral, nucleul locus coeruleus, nucleul cuneatus principal, nucleul gracile, nucleul tractului solitar, nucleii parabrahiali, nucleul paratrigeminal și unii dintre nucleii nervilor motori cranieni. Aferențele venite de la nucleii pontini se termină în diferite zone ale cortexului cerebelar, cu excepția lobului floculonodular etc.

Lucrarea este utilă cercetătorilor în neurofiziologie, neuroanatomie și neurochirurgie experimentală.

C. C. Prunescu

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of Chemicals to humans. Some Non-Nutritive Sweetening Agents (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică. la om. Unii edulcoranți), Volume 22, International Agency for Research on Cancer, Lyon, March 1980, 208 pagini

Volumul reprezintă opiniile grupului de lucru al experților IARC, întruniți la Lyon între 21 și 27 martie 1979.

În capitolul introductiv, care cuprinde generalități asupra substanțelor considerate (denumiri uzuale: ciclamați și zaharină), se subliniază răspîndirea acestor compuși și se arată motivele includerii lor în monografiile IARC, deși chiar pe animale de laborator riscul cancerogenic este discutabil, putînd fi atribuit, ca și alte efecte ale acestor compuși, impurităților conținute.

Denumirile de ciclamați și zaharină sînt generice, acestea desemnînd de fapt acidul ciclamic, sărurile sale de sodiu sau de calciu, ciclohexilamina și diciclohexilamina, respectiv zaharina

propriu-zisă, sărurile sale de sodiu sau calciu și orto-toluensulfonamida. Pentru fiecare dintre acești compuși sînt trecute în revistă datele fizice și chimice, considerînd și impuritățile rezultate din materia primă sau din procesul de producție; de asemenea producerea, utilizarea și metodele de analiză; în cadrul datelor biologice se acordă importanță dietei experimentale a animalelor de laborator, precum și administării împreună cu substanțe cunoscute drept cancerigene. Sînt expuse date privind efecte toxice și teratogenice asupra oamenilor și animalelor de laborator. Indicațiile asupra riscului de cancer la om nu sînt încă revelatoare.

Vl. Gheordunescu

IARC Monographs on the Evolution of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Sex Hormones (II) (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică la om. Hormonii sexuali (Partea a II-a)) Volume 21, International Agency for Research on Cancer, Lyon, December 1979, 583 pagini

Volumul reprezintă opiniile grupului de lucru al experților IARC, întruniți la Lyon între 21 și 27 noiembrie 1978. Pe baza cunoștințelor actuale, se reiau datele publicate în volumul 6 din 1974.

După expunerea, obișnuită pentru fiecare volum, a metodicii de lucru și de indexare a experților IARC, urmează o vedere de ansamblu asupra substanțelor considerate (estrogeni, progestine și androgeni), care cuprinde efectele fiziologice ale acestor substanțe, activitățile biologice ale preparatelor de hormoni steroidici, producerea și acțiunea fiziologică a hormonilor sexuali la om, farmacologia estrogenilor și progestinelor de sinteză. Sînt relevate de asemenea metabolismul hormonilor sexuali și metodele analitice de determinare. Sînt trecute în revistă datele cunoscute asupra relațiilor dintre acești hormoni și cancer; mutagenicitate, embriotoxicitate și teratogenicitate.

Sînt indexați atît hormonii naturali: estronă, progesteronă și testosteron, cît și medicamente de sinteză, utilizate cu acest rol: clorotrianizen, dietilstilbestrol; dimetisteron, megestrol; clomifen etc. Se menționează rolul unora dintre aceste substanțe ca contraceptice. Fiecare monografie cuprinde: date chimice și fizice; producere, utilizare și analiză; date biologice privind evaluarea riscului de cancerogeneză la om; aprecierea acestui risc la animale de experiență și la oameni; bibliografie. Volumul se încheie cu indexul general de substanțe considerate pînă în prezent.

Vl. Gheordunescu

Handling Chemical Carcinogens in the Laboratory. Problems of Safety (Utilizarea carcinogenilor clinici în laborator. Probleme de siguranță), R. Montesano și colab. (sub red.), IARC Scientific Publications No. 33, IARC, Lyon, 1979, 34 pagini

Cartea de față a apărut ca o cerință manifestată de-a lungul anilor, și anume de a avea un îndreptar al măsurilor de siguranță ce trebuie luate atunci cînd se lucrează cu substanțe cancerigene. Scopul acestui document, editat de Agenția internațională pentru cercetări asupra cancerului, este de a arăta cercetătorilor ce substanțe și ce condiții de lucru necesită măsuri de siguranță în special și în general, ce factori trebuie considerați pentru a reduce la minimum expunerea la carcinogenii clinici.

Prima parte a cărții se ocupă de definirea termenilor, în care se pune problema riscului de îmbolnăvire pentru diferite tipuri de laboratoare, timpului de expunere la o anumită substanță, concentrației acesteia în mediu. O dificultate majoră o constituie definirea termenului de carcinogen, deoarece în multe cazuri timpul scurs de la expunere la o anumită substanță și îmbolnăvire este foarte lung, precum și faptul că multe substanțe produc tumori la animale, dat nu la om. Capitolul al doilea prezintă unele procedee care ar putea fi utilizate pentru preîntîmpinarea contaminării laboratoarelor și personalului. În capitolul al treilea se discută metode de depistare și eliminare a carcinogenilor sau materialelor contaminate. Ultimul capitol se ocupă de responsabilitățile cercetătorului care lucrează cu substanțe cancerigene și dă unele indicații de ordin gene-

ral ce completează un bun program de protecție. La sfîrșitul cărții se dă o listă a domeniilor în care o cercetare suplimentară se cere cu insistență, ca de la studiul metodelor pentru distrugerea și eliminarea carcinogenilor clinici.

Ștefan Hulea

Centre International de recherche sur le cancer, Raport annuel 1979, Lyon, 1979

Volumul de față cuprinde raportul de activitate al Centrului Internațional de Cercetări asupra Cancerului pentru anul care a luat sfîrșit la 30 iunie 1979.

Prima parte este o privire de ansamblu asupra programului centrului și asupra domeniului cancerogenilor din mediul înconjurător. A doua parte a raportului descrie mai detaliat, pentru fiecare servici, activitățile și proiectele CIRC.

Astfel sînt analizate activitățile serviciilor: Epidemiologie și biostatistică; Cancerogeni din mediul înconjurător; Cancerogeni biologici; Cancerogeni chimici; Formarea cercetării și relațiilor externe; Programul interdisciplinar și de legături internaționale; Centrul de cercetări al CIRC din Singapore.

Volumul cuprinde lista personalului CIRC.

Mai multe anexe de la sfîrșit se referă la statele participante și la reprezentanții în sesiunile Consiliului de direcție și Consiliului științific, la acorduri de cercetare între diferite instituții etc.

Vl. Gheordunescu

Environmental carcinogens. Selected methods of analysis. Volume 3: *Analysis of Polycyclic aromatic hidrocarbons in environmental samples* (Carcinogeni din mediul înconjurător. Metode selecționate de analiză. Vol. 3: Analiza hidrocarburilor aromatice policiclice în probe din mediu), H. EGAN și colab. (sub redacția), IARC Publications No. 29. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1979, 240 pagini

Acest raport cuprinde studiul, din mai multe puncte de vedere, al hidrocarburilor aromatice policiclice. Scopul privește în primul rînd sănătatea publică, deoarece lucrarea, editată sub egida OMS și ALCC (Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului), își propune stabilirea riscului carcinogenic ce decurge din manipularea unor compuși aromatici policiclici. Deși lucrarea se înscrie în contextul mai larg al carcinogenezei ambientale, în volume se tratează metodica analizelor compușilor menționați, În acest sens se acordă o atenție specială aspectelor toxicologice.

În primul capitol sînt prezentate, din punctul de vedere al riscului carcinogenic, unele dintre substanțele aromatice polinucleare cel mai des folosite. Următoarele trei capitole prezintă în mod sistematic nomenclatura hidrocarburilor aromatice polinucleare, sursele lor de apariție și distribuția în natura și în probele de laborator. În următoarele cinci capitole se descriu luarea probelor (cu o referire specială asupra celor din atmosferă), solvenților și sistemelor de solvenți care se folosesc, extracția și îmbogățirea în hidrocarburi aromatice polinucleare a probelor, precum și separarea, detecția și identificarea acestor substanțe. După aceste considerații preliminare, în cuprinsul următoarelor opt capitole sînt prezentate metodele de analiză, într-un spirit concis, dar în mod complet. Sînt descrise metodele de analiză cele mai frecvent utilizate: cromatografie în strat subțire, spectrofluorimetrie, gazcromatografie, spectroluminescență, luminescența cvasiliniară etc.

Deși aparatura folosită nu este prezentată foarte detaliat, este explicitată astfel încît funcționarea ei poate fi rapid înțeleasă. Trebuie să menționăm foarte buna orînduire a materialului expus, stilul precis și elegant, precum și bibliografia care însoțește grupele de capitole referitoare la temele expunerii.

Mihai Zamfir

Topics in current chemistry. Biochemistry (Probleme de chimie curentă. Biochimie), vol. 83, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1979, 178 pagini, 84 figuri.

Acest volum cuprinde un număr de trei subiecte de biochimie din domenii destul de variate (biochimie animală, generală și microbiană). Prima problemă, „Vitamina D și metabolismul calciului", se ocupă în mod prioritar de cele mai importante aspecte ale metabolismului vitaminei D, cel al calciului fiind considerat în consecință ca o urmare cauzală a acțiunilor vitaminei. După o scurtă introducere, urmează în ordine: istoricul problemei, o vedere generală a metabolismului vitaminei D, biogeneza acestei vitamine și, abia după aceste capitole generale, capitolele mai ample ale lucrării. Acestea privesc enzimele care efectuează metabolismul vitaminei D, mecanismul de acțiune al 1,25-dihidroxivitaminei D, sinteza compușilor vitaminici D și, în fine, corelații structură — activitate. Trebuie să remarcăm faptul că fenomenele beneficiază de o dublă prezentare: *in vivo*, *in vitro*, cu discutarea acestei paralele, inclusiv efectele fiziologice, normale și patologice. În acest ultim caz se trec în revistă bolile ce decurg din feluritele perturbații ale metabolismului vitaminei D. Lucrarea are un riguros comentariu biochimic și este foarte bine ilustrată. Documentația este, de asemenea, foarte amplă (413 titluri).

Următoarea problemă, „Citocromul P_{450} și reacțiile de hidroxilare", dispune de o tratare deosebit de sistematică și logică. După un scurt capitol introductiv, se prezintă starea naturală și funcțiunile citocromului P_{450}. Sînt arătate apoi structura sa și cîteva probleme de nomenclatură. În directă legătură cu acestea urmează, conform unei ordini metabolice evidente, prezentarea donorilor de electroni (proteine ferosulfuroase, flavoproteine și citocromul b_5). După descrierea mecanismelor de acțiune a mono-oxigenazelor hem-sulf dependente, se trece la descrierea reglării activității enzimatice. Sînt comentate și alte oxigenaze și, pe lîngă acestea, sistemele model pentru monooxigenaze. Lucrarea se încheie cu o privire de ansamblu asupra problemei.

Cea de-a treia chestiune, „Antibiotice aminoglicozidice", este de fapt una dintre cele mai recente probleme ale biochimiei microbiene și, din acest motiv, deosebit de atractivă. Sînt arătate cele mai importante tipuri de compuși, sintezele lor totale și parțiale, mecanismele de acțiune și relațiile structurilor cu acțiunile lor biologice. Aspectele terapeutice sînt amplu prezentate, ele fiind criteriul fundamental pentru acești compuși.

Mihai Zamfir

YA. V. BELIK, *Neirohimia, bibliograficeskii ukazatel 1953—1962* (Neurochimia, Indicator bibliografic), Naukova Dumka, Kiev, 1979, 404 pagini

Progresele înregistrate în studiul funcționalității celulei nervoase și a sistemului nervos în general sînt dintre cele mai fascinante, iar acest gen de cercetări are un caracter prioritar în biologia modernă. Pentru obținerea de rezultate valoroase, un rol decisiv îl au folosirea unor tehnici de investigație sofisticate și o documentare asiduă în legătură cu tot ce s-a realizat pînă în prezent. În întîmpinarea ultimului deziderat vine și contribuția profesorului Ya. V. Belik, care și-a asumat misiunea — deloc facilă — de a elabora un indicator cu lucrările publicate în domeniul neurochimiei.

Indicatorul cuprinde, în prima parte, titlurile a 5650 de lucrări experimentale, sinteze și monografii, grupate pe ani, privind biochimia sistemului nervos, efectuate de circa 6000 specialiști, publicate în 25 limbi în perioada 1953—1962. Constatăm cu satisfacție că în volumul respectiv figurează și numeroase lucrări efectuate de 80 cercetători din țara noastră. Fiecare descriere bibliografică se termină cu informații privitoare la limba, în care au apărut lucrările originale și rezumatul lor. Se face de asemenea trimiterea la *Referativnii Jurnal*, în care acestea au fost recenzate.

Cartea mai conține două indexuri ajutătoare: indexul de termeni, constînd din 1300 cuvinte cheie, și indexul autorilor. Cu ajutorul acestor indexuri, cititorul poate se găsească rapid lucrarea care îl interesează.

În încheiere considerăm ca binevenită și utilă contribuția menționată și credem că autorul ei este preocupat în continuare de editarea unui volum care să cuprindă indicațiile bibliografice pînă în prezent, oferindu-ne astfel posibilitatea obținerii de informații cît mai recente în domeniul neurochimiei.

H. Tițu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție: 78200 — București 2, P.O.B. 2—2.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.
S. OERIU, I. OERIU, **Grupările tiolice şi rolul lor în biologie**, 1977, 332 p., 31 lei.
ELENA GABRIELESCU, **Neuroproteazele**, 1978, 157 p., 22 lei.
C. TAŞCĂ, **Histopatologia tiroidei**, 1978, 159 p., 20 lei.
IOANA MILCU, LYDIA NANU, **Glanda pineală ca organ metabolic**, 1979, 190 p., 9,50 lei.
CRISTOFOR SIMIONESCU, VALERIA GORDUZA, **Polimeri biocompatibili şi biologic activi**, 1980, 480 p., 36 lei.

1981 MAI 2 2

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 24, NR. 1, P. 1—124, BUCUREŞTI, IANUARIE—IUNIE 1981

43816

Lei 20

66 F1330 L: ohoho1

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 24

1981

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 24, nr. 2, p. 125 —222, 1981, Bucureşti

SCBIAS — 24 (2), (1981)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 de lei.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P. O. Box 136—137, telex 11226, 79517 — București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P. O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 24, nr. 2 1981

IULIE—DECEMBRIE

SUMAR

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Acţiunea plumbului şi a arsenului asupra metabolismului glucidic la şobolan 127

DANIELA BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, Separarea unui inhibitor natural al α-chimotripsinei din făină de soia prin cromatografie de afinitate pe α-chimotripsină imobilizată 135

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, ZOE ANCA, D. ROŞCA, Interacţiunea plumbului, arsenului şi seleniului asupra glutation-peroxidazei şi formării lipoperoxizilor în ficat şi rinichi la şobolan 143

R. CIUPE, SILVIA GABOR, E. FĂGĂRĂŞAN, L. POP, Identificarea gazcromatografică a unor steroizi urinari implicaţi în medicaţia anabolizantă . . . 149

V. DARIE, M. ŞERBAN, Comportarea sorbitoldehidrogenazei în diabetul aloxanic 157

VERONICA DINU, Peroxidarea lipidică în ateroscleroză 161

IOANA HAGIMA, Influenţa temperaturii asupra formelor moleculare multiple ale fosfatazei acide din grîu (*Triticum aestivum*) 167

EMANUELA IONESCU, P. PAPACOSTEA, Cercetări privind acţiunea antifungică a unor noi trinitrofenilamine şi trinitrofenilendiamine N,N'-disubstituite 171

M. A. MATEESCU, Metodă amiloclastică pentru determinarea selectivă a α-amilazei utilizînd substrat insolubil (notă preliminară) 175

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, A. WAHEED, Separarea prin cromatografie de afinitate a unui inhibitor natural al α-chimotripsinei din tuberculi de cartof şi unele proprietăţi ale acestuia 181

MARGARETA ŞERBAN, C. VLĂDESCU, CEZARINA CUCU, Cercetări asupra activităţii lizozimului în nefropatia acută experimentală 189

C. VLĂDESCU, EMILIA MURARIU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ŞERBAN, Interferenţa azidei de sodiu cu reactivul fosfovanilinic în metoda de dozare a lipidelor serice 195

REFERAT GENERAL

ELISABETA MIHĂILESCU, Factorul de creştere al nervului 201

RECENZII 213

St. cerc. biochim., 24, 2, 125—222 (1981)

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 24, N° 2 1981

JULY—DECEMBER

CONTENTS

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Effect of lead and arsenic on the carbohydrate metabolism in rats 127

DANIELA BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, Isolierung eines natürlichen α-Chymotrypsin-Hemmstoffes aus Sojabohnen durch Affinitätschromatographie an Trägerfixiertem α-Chymotrypsin. 135

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, ZOE ANCA, D. ROŞCA, Lipid peroxides and glutathione peroxidase in the liver and the kidney of lead, arsenic and selenium treated-rats 143

R. CIUPE, SILVIA GABOR, E. FĂGĂRĂŞAN, L. POP, Gas chromatographic identification of urinary steroids used as anabolisants 149

V. DARIE, M. ŞERBAN, Sorbitol dehydrogenase in alloxanic diabetes . . . 157

VERONICA DINU, Lipid peroxidation in atherosclerosis 161

IOANA HAGIMA, The influence of temperature on acid phosphatase multiple molecular forms in wheat *(Triticum aestivum)* 167

EMANUELA IONESCU, P. PAPACOSTEA, Antifungic action of some new trinitrophenyl amines and N,N-disubstituted trinitrophenylene diamines. 171

M. A. MATEESCU, A new amyloclastic method for the specific α-amylase determination using cross-linked amylose as an insoluble substrate (preliminary note) 175

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, A. WAHEED, Isolierung eines natürlichen α-chymotrypsin-Hemmstoffes durch Affinitätschromatographie aus Kartoffelknollen und einige Eigenschaften desselben 181

MARGARETA ŞERBAN, C. VLĂDESCU, CEZARINA CUCU, Lysozyme activity in experimental acute nephropathy 189

C. VLĂDESCU, EMILIA MURARIU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ŞERBAN, Interference of natrium azide with plasmatic lipid determination 195

GENERAL REVIEW

ELISABETA MIHĂILESCU, Nerve growth factor 201

REVIEWS 213

ACŢIUNEA PLUMBULUI ŞI A ARSENULUI ASUPRA METABOLISMULUI GLUCIDIC LA ŞOBOLAN

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. S-a studiat acţiunea toxică a plumbului (200 ppm) şi a arsenului (10 ppm) la şobolani albi, timp de 30 de zile, prin administrare separat şi în combinaţie în apă, asupra glicemiei, lactacidemiei, glicogenului tisular şi asupra unor indicatori legaţi de funcţia glandelor suprarenale. Rezultatele obţinute, în condiţiile administrării separate de arsen şi plumb, evidenţiază o creştere semnificativă a glicemiei şi lactacidemiei şi o scădere a glicogenului din ficat şi glandele suprarenale. În condiţiile administrării asociate de arsen + plumb, s-a evidenţiat o sumare de efecte la nivelul glicemiei şi lactacidemiei. Glandele suprarenale prezintă la toate loturile de animale studiate creşteri semnificative ale greutăţii lor relative, o scădere a conţinutului de glicogen şi tendinţe de scădere a acidului ascorbic.

Plumbul este un poluant major al mediului înconjurător, prezenţa lui în aer, apă şi alimente constituind o sursă permanentă de contaminare pentru om şi întreg ecosistemul.

Arsenul însoţeşte întotdeauna plumbul, cadmiul, cuprul în zonele din vecinătatea industriei metalurgiei neferoase.

În condiţiile de poluare a mediului ambiant, organismul uman şi animal este expus concomitent acţiunii combinate a diferitelor metale (Pb, Cd, Zn, Hg etc.). Prin pătrunderea lor simultană în organism, graţie unor afinităţi comune pentru diferiţi radicali ai proteinelor (1), (2), (3), între aceste elemente se stabilesc relaţii de acţiuni sinergice sau de antagonism (4), (5), (6), fapt ce poate duce la o perturbare a integrităţii funcţionale a organismului.

Astfel se cunoaşte că fiecare din aceste toxice (Pb, As, Cd) interferă cu procesele metabolice de utilizare celulară a hidraţilor de carbon, procese care sînt în relaţie cu activitatea de dehidrogenare şi fosforilare oxidativă, graţie afinităţilor specifice ale acestor metale pentru grupările SH ale enzimelor (3), (4), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

Avînd în vedere, pe lîngă aceste date, şi rolul energetic major al glucidelor în desfăşurarea proceselor vitale ale organismului, în lucrarea prezentă ne-am propus să urmărim acţiunea plumbului şi a arsenului, administrate izolat şi în asociere, asupra unor indicatori biochimici ai metabolismului glucidic la şobolan.

În acest sens am studiat glucoza din sînge ca termen iniţial al glicolizei, acidul lactic ca produs final al glicolizei anaerobe şi glicogenul tisular (ficat, rinichi, glande suprarenale) ca rezervă principală energetică.

St. cerc. biochim., 24, 2, 127–134 (1981)

Cunoscut fiind rolul hormonilor glucocorticoizi în procesele de reglare a homeostaziei glucozei şi în adaptarea organismului expus la diferiţi factori de mediu care pot acţiona ca factori stressanţi (13), (14), (15), (16), ne-am propus să investigăm şi unele aspecte legate de funcţia glandelor suprarenale prin determinarea greutăţii lor relative şi a conţinutului lor în glicogen şi acid ascorbic.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe şobolani albi masculi, în greutate iniţială de 160—180 g. Animalele au fost împărţite în 4 loturi după cum urmează :

I. Animale martor, tratate cu apă de robinet prin sondă intragastrică, zilnic timp de 30 de zile.

II. Animale tratate cu plumb (acetat) 200 ppm.

III. Animale tratate cu arsen (arsenit) 10 ppm.

IV. Animale tratate simultan cu plumb (200 ppm) şi arsen (10 ppm).

Toxicele au fost administrate intragastric cu ajutorul sondei zilnic, timp de 30 de zile. La sacrificare, animalele au fost anesteziate intraperitoneal cu nembutal (5 mg/100 g corp). S-au determinat glicemia (17), lactacidemia (18), glicogenul tisular din ficat, rinichi, glande suprarenale (19) şi acidul ascorbic (20). Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic, folosindu-se media aritmetică ($\bar{x}$), abaterea standard (σ) şi testul de probabilitate (p).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum reiese din tabela 1 şi figura 1, expunerea la arsen şi plumb, administrate separat şi în combinaţie, duce la afectarea homeostaziei glucozei, manifestată prin hiperglicemie. Glicemia este mai crescută la animalele tratate cu arsen, precum şi la lotul căruia i s-a administrat concomitent arsen şi plumb.

Determinările de acid lactic evidenţiază de asemenea o creştere semnificativă a acestui parametru la toate loturile de animale studiate. Şi în acest caz, administrarea combinată a arsenului şi a plumbului duce la o lactacidemie mai accentuată.

Creşterea accentuată a glucozei şi a acidului lactic la animalele tratate simultan cu arsen şi plumb demonstrează acţiunea sinergică a acestor două toxice ca o consecinţă a unor posibile afinităţi comune pentru anumite grupe funcţionale (grupări SH).

Astfel, creşterea lactacidemiei s-ar putea explica prin acţiunea toxică specifică a arsenului şi a plumbului la nivelul piruvatdehidrogenazei, complex enzimatic în cadrul căruia aceste metale ar acţiona la nivelul acid lipoic-dehidrogenază, enzimă SH (21), (22), (23). Acţionînd la acest nivel, glucoza nu mai este arsă în ciclul Krebs, iar acidul piruvic rezultat în glicoliză trece în acid lactic, crescînd în acest fel lactacidemia.

Ca urmare a acestui fapt, respiraţia celulară va avea de suferit prin decuplarea fosforilării oxidative, iar celulele vor fi private de aport energetic.

Glicogenul din ficat, organ principal de sinteză şi de depozitare (tabela 1, figura 2), este semnificativ scăzut la toate loturile de animale tratate. Această scădere, cauzată de aportul toxic al plumbului şi arsenului, poate fi pusă pe seama creşterii glicogenolizei, fapt ce ar explica în parte apariţia hiperglicemiei constatate.

Glicogenul din rinichi nu este modificat, comparativ cu martorul, la nici unul din loturile de animale studiate.

Glandele suprarenale prezintă scăderi importante ale cantității de glicogen la toate loturile de animale tratate, cantitatea cea mai scăzută întîlnindu-se la animalele tratate cu arsen + plumb.

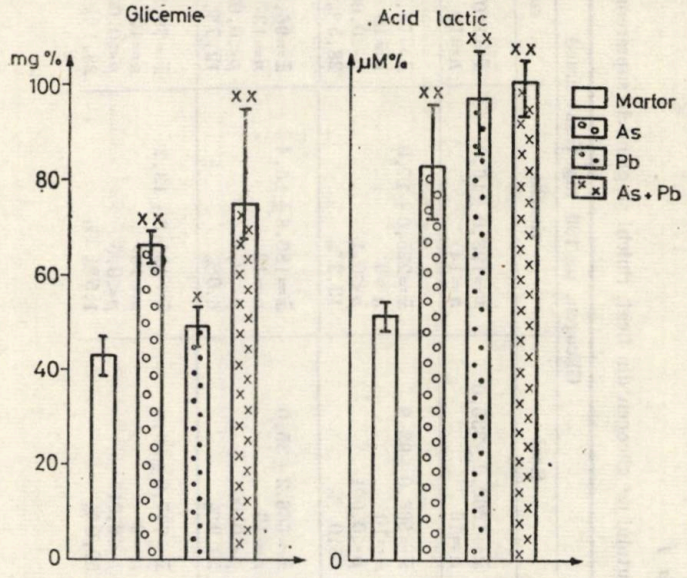


Fig. 1. — Valorile medii ale glicemiei și lactacidemiei la animalele tratate cu As, Pb și Pb+As.

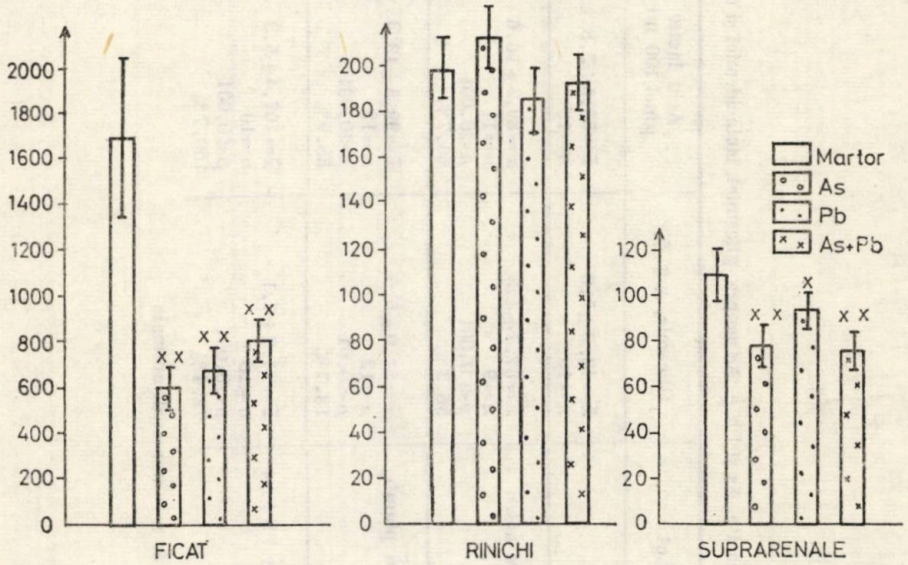


Fig. 2. — Valorile medii ale glicogenului (µg/100 mg țesut umed) din ficat, rinichi și glandele suprarenale la șobolanii tratați cu As, Pb și Pb+As.

** $p < 0,01$

* $p < 0,02$

Tabela 1

Acțiunea Pb, As și Pb + As asupra glicemiei, lactacidemiei și conținutului de glicogen din ficat, rinichi și glandele suprarenale la șobolan

Lot	Glicemie, mg %	Acid lactic μmol/100 ml	Glicogen, μg/100 mg țesut umed		
			ficat	rinichi	suprarenale
Martor	$\bar{x}=43,3\pm5,6$ $n=10$	$\bar{x}=53,5\pm2,8$ $n=13$	$\bar{x}=1660,0\pm336,0$ $n=10$	$\bar{x}=198,0\pm16,3$ $n=14$	$\bar{x}=110,0\pm15,0$ $n=10$
Tratat cu arsen	$\bar{x}=67,7\pm4,3$ $n=9$ $p<0,001$ 56,3%	$\bar{x}=89,2\pm16,6$ $n=11$ $p<0,001$ 66,7%	$\bar{x}=566,0\pm93,9$ $n=10$ $p<0,001$ 66,0 %	$\bar{x}=225,0\pm17,0$ $n=9$ $p<0,1$ 13,2%	$\bar{x}=78,9\pm8,9$ $n=10$ $p<0,001$ 28,5%
Tratat cu plumb	$\bar{x}=51,0\pm5,5$ $n=12$ $p<0,01$ 18,7%	$\bar{x}=99,5\pm13,4$ $n=12$ $p<0,001$ 85,9%	$\bar{x}=666,2\pm35,0$ $n=13$ $p<0,001$ 59,9%	$\bar{x}=186,8\pm16,4$ $n=13$ $p<0,1$ 6,0%	$\bar{x}=96,3\pm10,3$ $n=13$ $p<0,02$ 12,7%
Tratat cu Pb+As	$\bar{x}=74,8\pm7,1$ $n=10$ $p<0,001$ 72,4%	$\bar{x}=107,4\pm5,3$ $n=10$ $p<0,001$ 100,7%	$\bar{x}=797,0\pm59,0$ $n=9$ $p<0,01$ 52,0%	$\bar{x}=195,8\pm13,2$ $n=10$ $p<0,5$ 1,5%	$\bar{x}=79,3\pm7,4$ $n=10$ $p<0,001$ 28,1%

Notă. n = număr de animale

Depleția de glicogen la nivelul acestor organe s-ar putea datora unui consum energetic crescut, ca urmare a unei hiperfuncții a acestor glande prin expunere la plumb și arsen, toxice care acționează ca factori stresanți asupra organismului.

Datele din literatură pledează pentru faptul că, în urma unei hiperfuncții a glandelor suprarenale, se produc modificări importante la nivelul metabolismului glucidic (24). Astfel s-a semnalat că la șobolanii adulți, în cursul stressului acut și cronic, se modifică caracteristic glicemia, glicogenul și

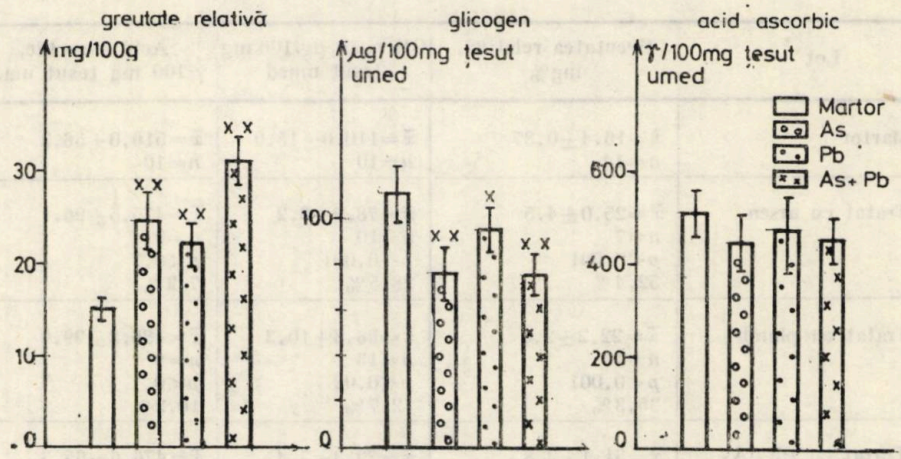


Fig. 3. — Valorile medii ale greutății relative a glandelor suprarenale și cantitatea de glicogen și acid ascorbic din glandele suprarenale la șobolanii tratați cu As, Pb și Pb+As.

** $p < 0,01$
* $p < 0,02$

funcția insulino-secretoare a pancreasului endocrin, precum și sensibilitatea organelor față de insulină (13), (14). În acest sens, în lucrarea prezentă am urmărit și unele aspecte de glucoreglare cu privire la funcția glandelor suprarenale.

În tabela 2 și figura 3 sînt redate valorile greutății relative a glandelor suprarenale, precum și cantitatea de glicogen și acid ascorbic din aceste glande la animalele tratate cu plumb, arsen și plumb + arsen. După cum reiese din tabel, expunerea la plumb și arsen administrate separat duce la o creștere semnificativă a greutății relative a glandelor suprarenale.

În cazul administrării combinate de arsen + plumb, glandele suprarenale prezintă creșteri mai pronunțate, evidențiindu-se și în acest caz o potențare de efecte ale celor două metale.

Conținutul în acid ascorbic al suprarenalelor prezintă o tendință de scădere la toate loturile de animale tratate cu plumb și arsen comparativ cu lotul martor, însă fără o semnificație statistică.

Rezultatele obținute de noi sînt în acord cu datele unor autori privind rolul energetic major al acidului ascorbic și al glicogenului din glandele suprarenale în secreția de ACTH și hormoni glucocorticoizi în condiții de stress, inclusiv cel de natură toxică (25), (26).

Sindromul de adaptare descris de Selye (15) constă în secreţie suprarenală crescută, dovadă a acestei acţiuni fiind faptul că, la o solicitare mai îndelungată a glandelor suprarenale, ele cresc în volum, iar conţinutul în glicogen şi acid ascorbic scade.

Tabela 2

Greutatea relativă şi conţinutul de glicogen şi acid ascorbic din glandele suprarenale la şobolanii trataţi cu As, Pb şi As+Pb

Lot	Greutatea relativă, mg%	Glicogen, μg/100 mg ţesut umed	Acid ascorbic, γ/100 mg ţesut umed
Martor	$\bar{x}=16,4\pm0,87$ $n=14$	$\bar{x}=110,0\pm15,0$ $n=10$	$\bar{x}=516,0\pm56,2$ $n=10$
Tratat cu arsen	$\bar{x}=25,0\pm4,5$ $n=7$ $p<0,001$ 52,4%	$\bar{x}=78,9\pm8,2$ $n=10$ $p<0,001$ 28,5%	$\bar{x}=475,5\pm96,4$ $n=9$ $p<0,1$ 7,9%
Tratat cu plumb	$\bar{x}=22,2\pm2,1$ $n=10$ $p<0,001$ 35,3%	$\bar{x}=96,3\pm10,3$ $n=13$ $p<0,02$ 12,7%	$\bar{x}=486,8\pm99,0$ $n=9$ $p<0,1$ 10,2%
Tratat cu Pb+As	$\bar{x}=31,1\pm2,8$ $n=8$ $p<0,001$ 89,6%	$\bar{x}=79,3\pm7,4$ $n=10$ $p<0,001$ 28,1%	$\bar{x}=476,6\pm65,3$ $n=10$ $p<0,1$ 7,7%

Notă. n = număr de animale

Rezultatele obţinute sugerează că afectarea homeostaziei glucozei, provocată de acţiunea plumbului şi a arsenului, ar putea fi o consecinţă a creşterii reactivităţii glandelor suprarenale la efectul stressant al acestor toxice.

CONCLUZII

1. Administrarea separată de arsen şi plumb timp de 30 de zile duce la o hiperfuncţie a glandelor suprarenale, care prin acţiuni antiinsulinice afectează homeostazia glucozei, şi, în consecinţă, apar :

a) hiperglicemie, cauzată de glicogenoliză hepatică crescută, de scăderea sensibilităţii ţesuturilor periferice la insulină şi de arderea incompletă a glucozei în ciclul Krebs;

b) hiperlactacidemie, urmare a creşterii glicolizei anaerobe şi unei insuficiente treceri a piruvatului în ciclul Krebs datorită acţiunii toxice specifice a acestor metale la nivelul complexului enzimatic piruvat-carboxilază.

2. Administrarea combinată de arsen și plumb provoacă efecte aditive la nivelul metabolismului glucidic la șobolan.

Prezentat la redacție
la 28 februarie 1981

Institutul de igienă și sănătate publică, Cluj-Napoca,
Laboratorul de medicina muncii

EFFECT OF LEAD AND ARSENIC ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN RATS

SUMMARY

Male rats, divided into three groups, were given peroral a daily dose of 200 ppm Pb (as acetate), 10 ppm As (as arsenite) and simultaneously 200 ppm Pb + 10 ppm As, for 30 days. Tape water was administered to the control rats. The determinations of glucose and lactic acid in the blood and of glycogen in the liver, kidney and adrenal glands were performed. Adrenal weight as well as the content of glycogen and ascorbic acid were measured for the functional evaluation of these glands. A significant increase of blood glucose and lactic acid and a decrease of liver and adrenal glycogen, following the intake of lead, arsenic, and lead + arsenic respectively, were observed. Adrenal glands disclosed a hyperactivity reflected by an increased weight and a fall of their glycogen content. Lead and arsenic given simultaneously exhibited an additive toxic effect on the investigated parameters of the carbohydrate metabolism and on the adrenals.

BIBLIOGRAFIE

1. B. FOWLER, A. MAHAFEY, Environm. Hlth Perspect., **25**, 87 (1978).
2. L. DÈROBERT, *Intoxications et Maladies Professionelles*, Ed. Flammarion, Paris, 1954, p. 506.
3. L. S. GOODMAN, A. GILMAN, *Bazele farmacologice ale terapeuticii medicale*, Edit. medicală, București, 1960, p. 837.
4. M. J. IOANID, *Toxicologie*, Edit. medicală, București, 1965, p. 213.
5. H. C. PETERING, M. A. JOHNSON, Arch. Environm. Hlth, **23**, 93 (1971).
6. Z. A. SAICH, O. J. LUCIS, Arch. Environm. Hlth, **24**, 419 (1972).
7. J. ESINGER, *Biochemistry and Measurement of Environmental Lead Intoxication*, Quarterly Review of Biophysics, II, **46**, 437 (1978).
8. B. L. VALLEE, D. D. ULMER, W. E. C. WACKER, Arch. Industr. Hlth, **21**, 132 (1960).
9. C. M. SCHILLER, B. A. FOWLER, Chem. Biol. Interactions, **22**, 25 (1978).
10. B. A. FOWLER, J. S. WOODS, C. M. SCHILLER, Environm. Hlth Perspect., **19**, 197 (1977).
11. V. BENCKO, P. RÖSSNER, M. MOKRY, J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol., **19**, 17 (1975).
12. A. BRUCE, B. A. FOWLER, Environm. Hlth Perspect., **25**, 87 (1978).

13. S. NEMETH, în *Hormones Metabolism and Stress*, Publish. House of the Slovak Acad. of Sci., Bratislava, 205 (1975).
14. S. NEMETH, în *Hormones Metabolism and Stress*, Publish. House of the Slovak Acad. of Sci., Bratislava, 142 (1973).
15. H. SELYE, *Hormone and Metabolism*, vol. I—II, Springer, Berlin—Heidelberg—NewYork, 1971, p. 104.
16. M. J. SEITZ, Acta Biol. Med. Germ., **35**, 141 (1976).
17. S. D. HUGGET, D. A. NIXON, Lancet, *2682*, 273 (1957).
18. H. U. BERGMEYER, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York — London, 1963, p. 788.
19. R. MONTGOMERY, Arch. Biochem. Biophys., **67**, 378 (1957).
20. J. C. ROE, C. A. KUTHER, J. Biol. Chem., **399**, 742 (1947).
21. R. A. GOYER, B. C. RHYNE, *Pathobiology of Cell Membranes*, vol. I, Academic Press, New York, 1975, p. 383.
22. V. GALEA, M. WEINLICH, Z. PIERSICĂ, Igiena, **21**, 207 (1972).
23. Z. ANCA, S. GABOR, *Spurenelement*, Symposium Arsen, Jena, 1980, p. 167.
24. A. GOTH, M. GOTH, L. LENGYEL, Physiology, **230**, 1004 (1957).
25. P. K. DIXIT, A. LAZAROV, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **124**, 719 (1967).
26. I. MADAR, N. ŞILDAN, I. ILONCA, St. cerc. biol., Seria biol. anim., **29**, 63 (1977).

SEPARAREA UNUI INHIBITOR NATURAL AL α-CHIMOTRIPSINEI DIN FĂINĂ DE SOIA PRIN CROMATOGRAFIE DE AFINITATE PE α-CHIMOTRIPSINĂ IMOBILIZATĂ

DANIELA BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED

Rezumat. Inhibitorul izolat din făină de soia prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată se prezintă la electroforeză în gel de poliacrilamidă ca o fracţiune proteică omogenă cu o viteză de migrare anodică relativ mică şi exercită o inhibiţie competitivă atît asupra activităţii proteolitice, cît şi asupra celei esterazice a α-Cht. Acţiunea inhibitorului se manifestă mai puternic asupra activităţii proteolitice şi este întotdeauna mai slabă în cazul enzimei imobilizate, ceea ce rezultă şi din valorile constantelor de inhibiţie respective.

În cercetări anterioare (1) am separat un inhibitor natural al α-chimotripsinei (α-Cht) din tuberculi de cartof prin cromatografie de afinitate pe un suport afin format din α-Cht imobilizată pe agaroză reticulată.

În lucrarea de faţă prezentăm rezultatele obţinute la folosirea aceluiaşi suport afin pentru izolarea unui inhibitor natural al α-Cht din făină de soia. Prezentăm totodată şi unele proprietăţi caracteristice ale inhibitorului izolat, ca, de pildă, efectul său asupra activităţii proteolitice a α-Cht libere şi imobilizate (substrat cazeină), asupra activităţii esterazice (substrat N-acetil-L-tirozin-etil-eter — ATEE, N-benzoil-L-tirozin-etil-eter — BTEE, N-benzoil-L-arginin-etil-ester — BAEE) a celor două preparate enzimatice, comportarea sa la electroforeză în gel de poliacrilamidă, precum şi constantele sale de inhibiţie determinate pentru activitatea proteolitică şi cea esterazică atît în cazul enzimei libere, cît şi în cel al α-Cht imobilizate pe un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN.

Se ştie că numeroase ţesuturi animale şi vegetale au capacitatea de a elabora componente de natură proteică ce acţionează ca inhibitori asupra enzimelor proteolitice. Aceşti inhibitori au de regulă o greutate moleculară relativ mică şi joacă un important rol de protecţie în organismele respective (2). Izolarea şi studiul acestor inhibitori naturali ai proteazelor prezintă interes atît pentru cercetarea fundamentală, cît şi pentru practică (medicină, industria alimentară şi farmaceutică etc.).

MATERIAL ŞI METODE

Drept suport afin pentru separarea prin cromatografie de afinitate a inhibitorului natura al α-Cht dintr-un extract brut de făină de soia s-a folosit un preparat de α-Cht imobilizată cu un conţinut în enzimă de 0,8 mg α-Cht/mg gel, o activitate proteolitică reziduală de 55% (substrat cazeină) şi o activitate esterazică reziduală de 84% (substrat ATEE). Preparatul de α-Cht imobilizată a fost obţinut prin legarea covalentă a α-Cht de un gel perlat de agaroză reticulată cu epiclorhidrină şi activată cu BrCN (1).

Extractul folosit pentru separarea inhibitorului s-a obţinut prin tratarea a 3 g făină de soia cu 15 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7, 6, lăsînd apoi amestecul de extracţie să stea timp de 2 ore la temperatura camerei, după care s-a centrifugat. Supernatantul obţinut conţine 36 mg proteină/ml şi este folosit ca atare pentru izolarea inhibitorului α-Cht conţinut în el. În acest scop s-au aplicat 5 ml din extractul centrifugat pe o coloană cromatografică de 0,8 × 18 cm (10 ml gel de α-Cht imobilizată), conexată de un colector automat de fracţiuni cu înregistrare grafică a extincţiei la 280 nm (LKB, Suedia) şi s-au cules probe de cîte 5 ml la o viteză de scurgere de 50 ml/oră. După trecerea completă a proteinelor nereţinute de suportul afin, se aplică un eluant format dintr-o soluţie de KCl 0,5 M în HCl 0,1 N (pH 2), care eluează inhibitorul reţinut de α-Cht imobilizată prin adsorbţie biospecifică.

Omogenitatea electroforetică a inhibitorului izolat a fost verificată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă după metoda lui Davis (3).

Acţiunea inhibitorului asupra activităţii proteolitice s-a urmărit determinîndu-se activitatea proteolitică a α-Cht libere şi imobilizate (substrat cazeină) după metoda lui Kunitz (4), modificată de Rick (5), în prezenţa unor cantităţi de inhibitor cuprinse între 0 şi 100 μg în mediul de reacţie. La urmărirea efectului inhibitorului asupra activităţii esterazice a celor două preparate de enzimă s-au folosit trei substrate sintetice, şi anume ATEE, BTEE şi BAEE, aplicînd în cazul ATEE şi BAEE metoda indicată de Schwert şi Takenaka (6), iar în cazul BTEE metoda lui Hummel (7) şi folosind în mediul de reacţie cantităţi de inhibitor cuprinse, de regulă, tot între 0 şi 100 μg.

Constantele de inhibiţie (K_i) ale inhibitorului izolat au fost determinate după metoda grafică a lui Dixon, urmărindu-se activitatea proteolitică şi esterazică a enzimei libere şi legate şi la o a doua concentraţie de substrat (S_2), care prezenta jumătate din cantitatea folosită la prima serie de determinări (S_1). Amănuntele de metodă sînt expuse într-o lucrare recent publicată (8).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum rezultă din diagrama de eluţie (fig. 1), suportul afin, format din α-Cht imobilizată pe agaroză reticulată, reţine prin adsorbţie bioselectivă din extractul brut de făină de soia o fracţiune proteică ce se eluează de pe coloana cromatografică în urma aplicării eluantului format dintr-o soluţie de KCl 0,5 M în HCl 0,1 N. Această fracţiune se găseşte eluată în trei eprubete (nr. 16—18) şi conţine în total 8,25 mg proteină (4,5% din cantitatea totală de proteină aplicată pe coloană), ceea ce corespunde la o capacitate de adsorbţie bioselectivă a suportului afin de 0,825 mg inhibitor/ml gel enzimatic. La determinarea efectului fracţiunii proteice eluate asupra activităţii proteolitice a α-Cht (substrat cazeină), folosind cîte 0,2 ml din cele trei eprubete, se constată o acţiune de inhibiţie a cărei intensitate este proporţională cu concentraţia proteică din probă, fiind maximă la eprubeta nr. 17. Fracţiunea proteică eluată de pe coloana cromatografică reprezintă deci inhibitorul α-Cht reţinut de suportul afin din extractul de făină de soia. Unitatea de inhibiţie este dată în μg α-Cht inhibată de 0,2 ml din proba colectată.

Din analiza electroforetică pe gel de poliacrilamidă (fig. 2) rezultă că inhibitorul izolat prin cromatografie de afinitate din extractul brut de făină de soia, care conţine peste 20 de fracţiuni proteice (fig. 2, *a*), este omogen din punct de vedere electroforetic, fiind format dintr-o singură bandă proteică (fig. 2, *b*) cu o viteză de migrare anodică relativ mică. Localizarea pe electroforegramă a inhibitorului izolat din soia seamănă foarte

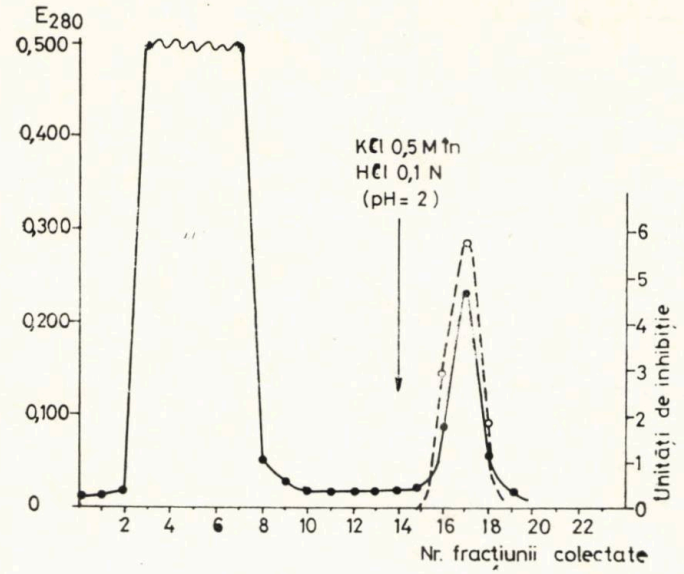


Fig. 1. — Diagrama de separare a inhibitorului natural al α-Cht din semințe de soia prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe gel perlat de agaroză reticulată și activată cu BrCN. Dimensiunea coloanei cromatografice : 0,8×18 cm. Volumul fracțiunilor culese : 5 ml.

●——● = concentrația proteică (extincția la 280 nm)

○——○ = inhibiția activității proteolitice (substrat cazeină), exprimată în unități de inhibiție.

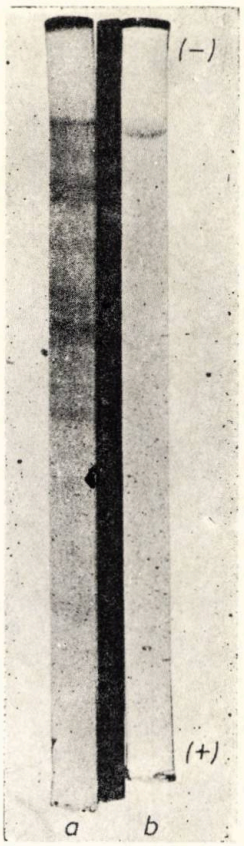


Fig. 2. — Proteinogramele obținute prin disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă a extractului brut din făină de soia (*a*) și a inhibitorului α-Cht purificat prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată (*b*).

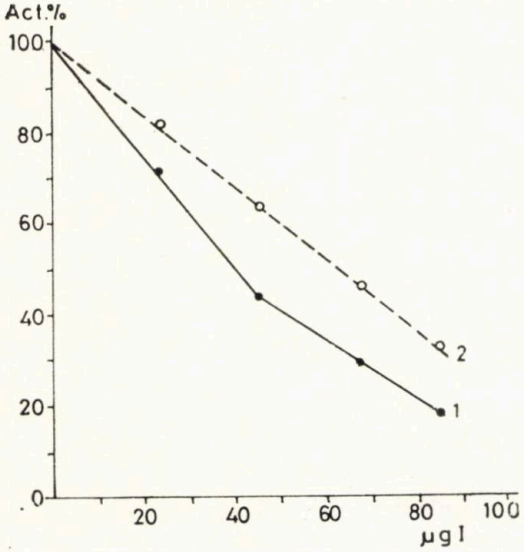


Fig. 3. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (1) și imobilizate (2) în funcție de concentrația inhibitorului izolat din făină de soia. Concentrația enzimei folosite în probă : 6 µg enzimă liberă și 20 µg enzimă imobilizată (0,025 ml gel enzimatic).

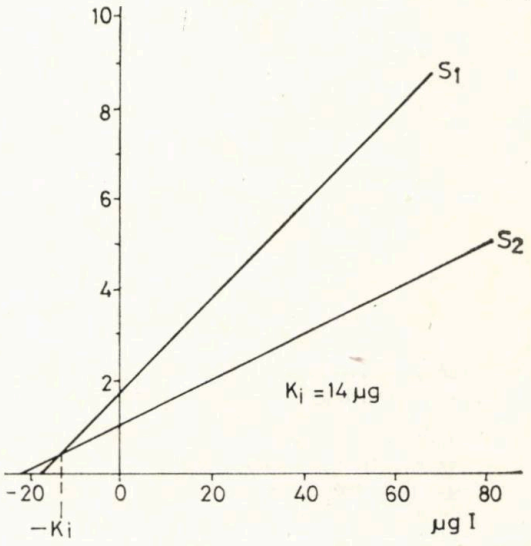


Fig. 4. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea proteolitică (substrat cazeină) a α-Cht libere. Cele două soluții de substrat folosite în reacție conțineau 1 %(S_1) și, respectiv, 0,5 % (S_2) cazeină în tampon borat 0,1 M, pH 8,0.

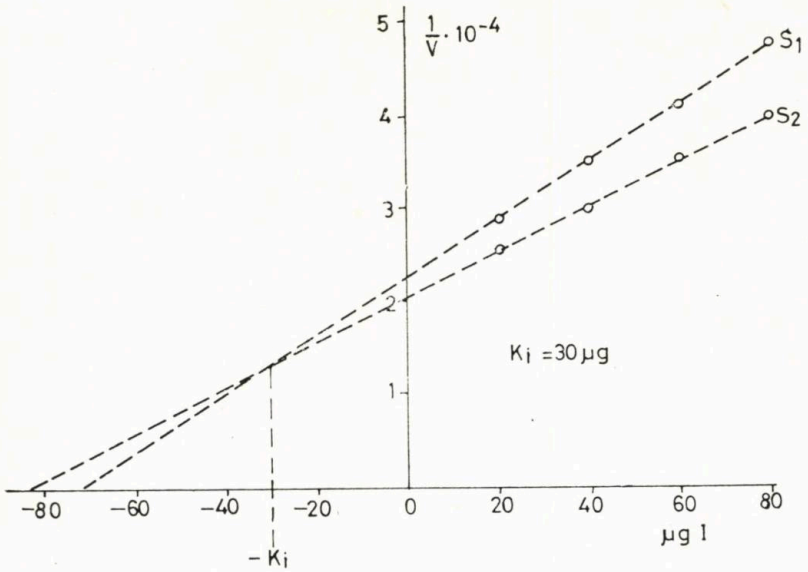


Fig. 5. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea proteolitică a α-Cht imobilizate. Cele două soluții de substrat folosite în reacție conțineau 1 % (S_1) și respectiv, 0,5 % (S_2) cazeină în tampon borat 0,1 M, pH 8,0.

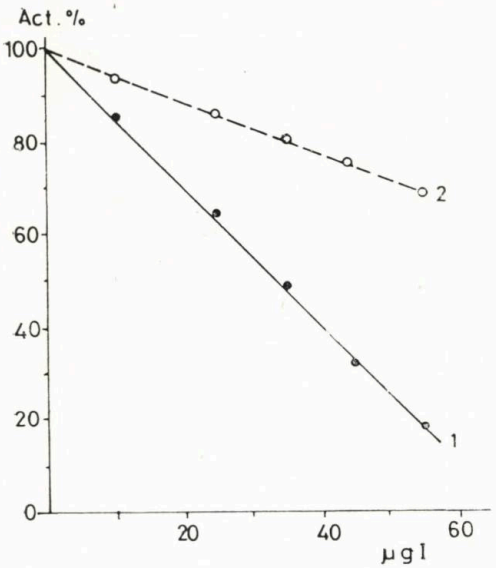


Fig. 6. — Variația activității esterazice (substrat ATEE) a α-Cht libere (1) și imobilizate (2) în funcție de concentrația inhibitorului izolat din făină de soia. Cantitatea de enzimă folosită în probă a fost de 6 μg în cazul α-Cht libere și de 40 μg în cazul α-Cht imobilizate.

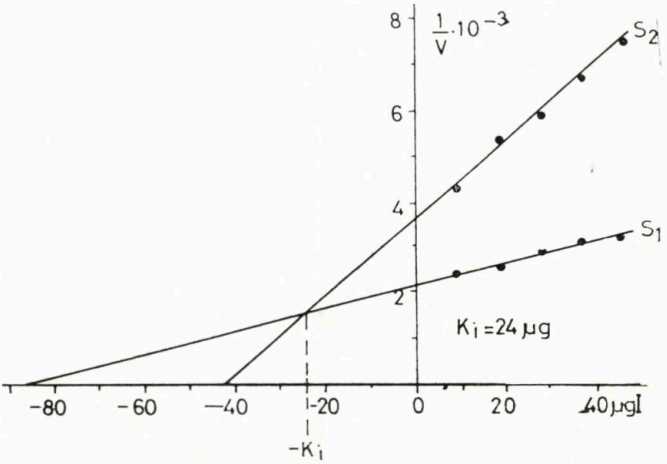


Fig. 7. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea esterazică (substrat ATEE) a α-Cht libere. Cele două concentrații de substrat folosite în reacție au fost de 0,0062 M (S_1) și de 0,0031 M ATEE (S_2), realizate în soluție tampon fosfat 0,067 M, pH 7,0.

mult cu cea observată de noi (1) la un inhibitor natural al α-Cht izolat din tuberculi de cartof.

Urmărind acţiunea unor cantităţi crescînde ale inhibitorului izolat asupra activităţii proteolitice a α-Cht libere şi imobilizate (fig. 3), se constată o scădere pronunţată a activităţii proteolitice a enzimei libere cu creşterea cantităţii inhibitorului din amestecul de reacţie. Curbe cu un aspect similar au fost obţinute de Rhodes şi colab. (9) în studiul acţiunii unui inhibitor izolat din albuş de ou asupra activităţii proteolitice a tripsinei şi α-Cht. Din figura 3 rezultă totodată că enzima imobilizată este mai puţin sensibilă la acţiunea inhibitorului studiat, prezentînd, de pildă, la o cantitate de 100 μg inhibitor în probă încă 30% din activitatea ei iniţială, spre deosebire de enzima liberă, care în aceste condiţii îşi mai păstrează doar un rest de 8% din activitatea ei iniţială în absenţa inhibitorului. Această comportare se oglindeşte şi în valorile K_i obţinute pentru acest inhibitor în cazul α-Cht libere (fig. 4) şi al celei imobilizate (fig. 5), valoarea K_i fiind dublă în cazul enzimei imobilizate în comparaţie cu cea a enzimei libere. Valoare a K_i indică, după cum se ştie, inversul afinităţii unei enzime faţă de un inhibitor al ei, ceea ce înseamnă că, cu cît valoarea acestei constante este mai crescută, cu atît enzima este mai puţin afectată de inhibitorul respectiv. Din reprezentările grafice redate în figurile 4 şi 5 rezultă şi faptul că inhibiţia exercitată de inhibitorul izolat din soia asupra activităţii proteolitice este de tip competitiv.

În cele ce urmează redăm pe scurt rezultatele obţinute în studiul acţiunii inhibitorului izolat din soia asupra activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate.

În figura 6 se prezintă acţiunea inhibitorului izolat asupra activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate, folosindu-se ca substrat ATEE. Odată cu creşterea cantităţii inhibitorului în amestecul de reacţie, se observă şi în acest caz o inhibare progresivă a activităţii catalitice a celor două preparate enzimatice, enzima imobilizată prezentînd însă o stabilitate mai crescută faţă de acest inhibitor atît în comparaţie cu enzima liberă, cît şi în comparaţie cu comportarea ei privind activitatea proteolitică. Astfel, în timp ce enzima liberă îşi pierde în prezenţa a 55 μg inhibitor în probă peste 80% din activitatea ei iniţială, cea imobilizată mai păstrează în aceste condiţii încă 70% din activitatea ei maximă.

Figurile 7 şi 8 redau determinarea grafică a valorilor K_i ale inhibitorului pentru activitatea esterazică a α-Cht libere (fig. 7) şi imobilizate (fig. 8) după metoda indicată de Dixon. Se constată şi în acest caz o creştere considerabilă a valorii K_i în urma imobilizării α-Cht. Inhibiţia observată este tot competitivă.

În cazul folosirii de BTEE ca substrat la determinarea activităţii esterazice a α-Cht libere şi legate în prezenţa unor doze crescînde de inhibitor în amestecul de reacţie (fig. 9), se observă o scădere mai puţin bruscă la enzima liberă în comparaţie cu cea care are loc în cazul activităţii proteolitice (fig. 3). Activitatea esterazică a enzimei imobilizate este şi în acest

caz mai puțin afectată de inhibitorul folosit. Figurile 10 și 11 prezintă curbele de determinare grafică a valorilor K_i pentru inhibitorul studiat

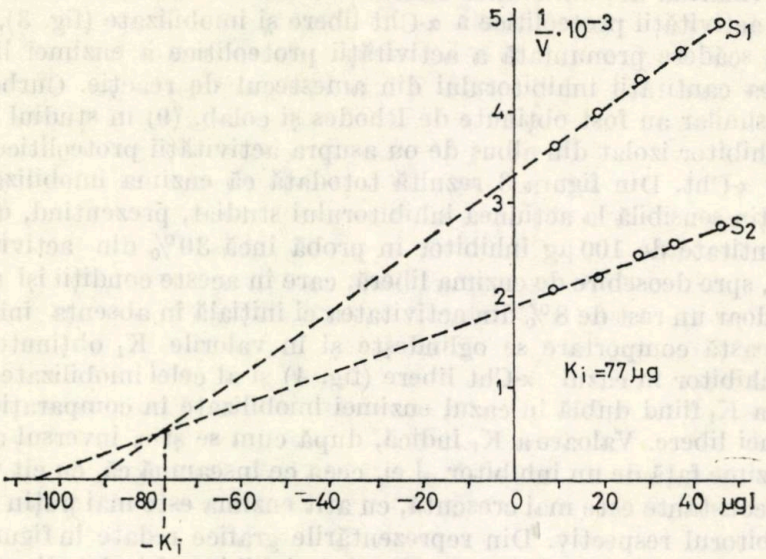


Fig. 8. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia în cazul activității esterazice (substrat ATEE) a α-Cht imobilizate. Cele două concentrații de substrat folosite în reacție au fost de 0,0062 M (S_1) și de 0,0031 M ATEE (S_2), realizate în soluție tampon fosfat 0,067 M, pH 7,0.

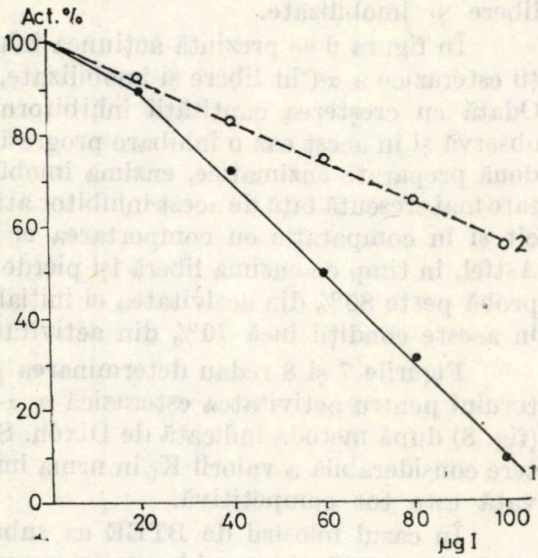


Fig. 9. — Variația activității esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (1) și imobilizate (2) în funcție de concentrația inhibitorului izolat din făină de soia. În mediul de reacție s-au folosit 6 µg α-Cht liberă și, respectiv, 40 µg enzimă imobilizată.

în cazul activității esterazice (substrat BTEE) la α-Cht liberă (fig. 10) și imobilizată (fig. 11).

Determinînd, în sfîrșit, acțiunea inhibitorului izolat din soia asupra activității esterazice a α-Cht libere și imobilizate și în cazul folosirii de BAEE

ca substrat, care este de fapt un substrat specific pentru papaină, se constată de data aceasta (fig. 12) o acțiune slabă a inhibitorului nu numai asupra enzimei libere, dar și asupra celei imobilizate. Astfel, se observă

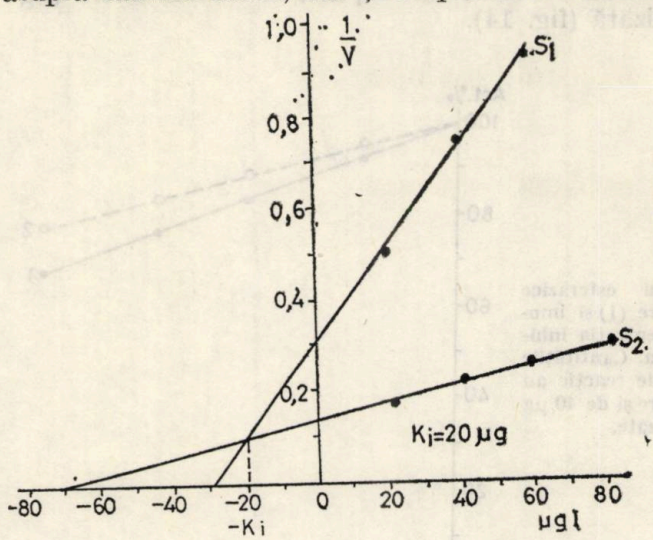


Fig. 10. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea esterazică (substrat BTEE) a α-Cht libere. Concentrația celor două soluții de BTEE a fost de 0,0006 M(S_1) și, respectiv, de 0,0003 M(S_2), realizate în tampon Tris-HCL 0,08, M, 7,8, cu $CaCl_2$ 0,1 M.

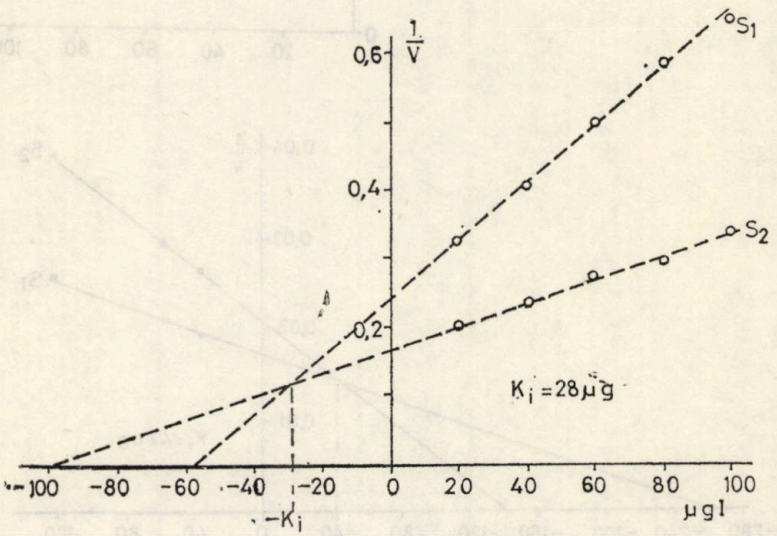


Fig. 11. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea esterazică (substrat BTEE) a α-Cht imobilizate. Concentrația celor două soluții de BTEE a fost de 0,0006 M (S_1) și, respectiv, de 0,0003 M (S_2), realizate în tampon Tris—HCl 0,08 M, pH 7,8, cu $CaCl_2$ 0,1M.

la enzima liberă, chiar în prezența a 120 µg inhibitor în probă, încă o activitate esterazică de 65%. Interesant de remarcat este și faptul că enzima imobilizată nu se comportă mult diferit de enzima liberă la folosirea de BAEE ca substrat, dar prezintă totuși întotdeauna o activitate esterazică ceva mai ridicată decît enzima liberă.

Această comportare mai deosebită a inhibitorului izolat din soia în cazul folosirii BAEE ca substrat la determinarea activităţii esterazice se oglindeşte şi în valorile relativ crescute ale K_1 atît la enzima liberă (fig. 13), cît şi la cea imobilizată (fig. 14).

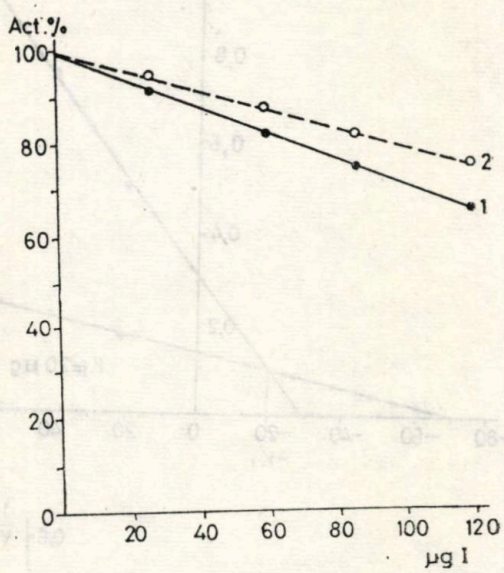


Fig. 12. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BAEE) a α-Cht libere (1) şi imobilizate (2) în funcţie de concentraţia inhibitorului izolat din făină de soia. Cantităţile de enzimă folosite în mediul de reacţie au fost de 6 µg în cazul α-Cht libere şi de 40 µg în cazul celei imobilizate.

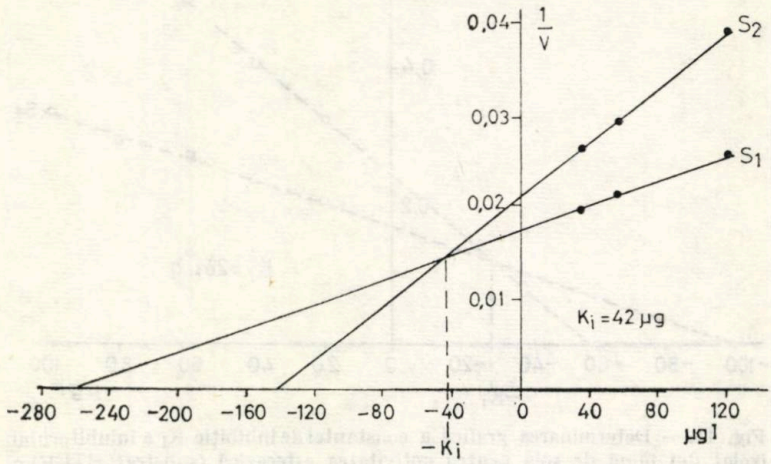


Fig. 13. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie K_i a inhibitorului extras din făină de soia în cazul activităţii esterazice (substrat BAEE) a α-Cht libere. Concentraţia BAEE din cele două soluţii de substrat folosite a fost de 0,00025 M (S_1) şi, respectiv, 0,000125 M (S_2), realizate în tampon fosfat 0,067 M, pH 7,6.

Tabela 1 cuprinde valorile constantelor de inhibiţie ale inhibitorului izolat din soia prin cromatografie de afinitate sistematizate în funcţie de activitatea catalitică urmărită, de substratul întrebuinţat şi de starea

enzimei folosite în reacţie. Din această tabelă se poate observa că inhibitorul are o acţiune mai puternică asupra activităţii proteolitice a α-Cht şi acţionează mai slab asupra activităţii esterazice (valori K_i mai crescute). În cazul folosirii BAEE ca substrat, inhibitorul are acţiunea cea mai scă-

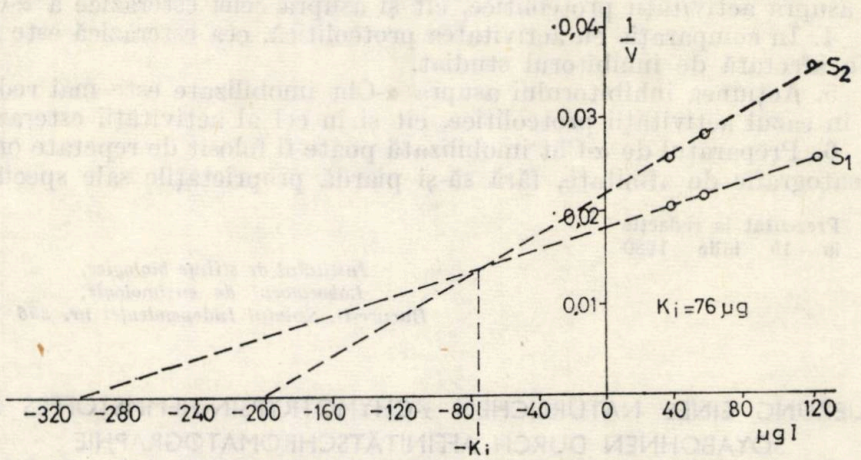


Fig. 14. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie K_i a inhibitorului izolat din făină de soia pentru activitatea esterazică (substrat BAEE) a α-Cht imobilizate. Concentraţia BAEE din cele două soluţii de substrat folosite a fost de 0,00025 M (S_1) şi, respectiv, 0,000125 M (S_2), realizate în tampon fosfat 0,067 M, pH 7,6.

sută asupra activităţii esterazice. Datele cuprinse în tabela 1 arată totodată că prin imobilizare α-Cht devine mai stabilă faţă de acţiunea inhibitorului ztudiat.

Tabela 1

Constantele de inhibiţie (K_i) ale inhibitorului natural al α-Cht izolat din făină de soia, determinate după metoda grafică a lui Dixon, pentru activitatea proteolitică şi esterazică a α-Cht libere şi imobilizate

Preparatul enzimatic folosit	K_i pentru activitatea proteolitică (substrat cazeină) (µg inhibitor/probă)	K_i pentru activitatea esterazică		
		substrat ATEE (µg inhibitor/probă)	substrat BTEE (µg inhibitor/probă)	substrat BAEE (µg inhibitor/probă)
α-Cht liberă	14	24	20	42
α-Cht imobilizată	30	77	28	76

CONCLUZII

1. Prin cromatografie de afinitate pe un suport afin format de α-Cht imobilizată s-a izolat dintr-un extract brut de făină de soia, într-o singură treaptă de lucru, un inhibitor natural al α-Cht.

2. Inhibitorul izolat este omogen din punct de vedere electroforetic, prezentînd o singură bandă proteică cu o viteză de migrare anodică relativ mică.

3. Inhibitorul izolat manifestă o acțiune de inhibiție competitivă atît asupra activității proteolitice, cît și asupra celei esterazice a α-Cht.

4. În comparație cu activitatea proteolitică, cea esterazică este mai puțin afectată de inhibitorul studiat.

5. Acțiunea inhibitorului asupra α-Cht imobilizate este mai redusă atît în cazul activității proteolitice, cît și în cel al activității esterazice.

6. Preparatul de α-Cht imobilizată poate fi folosit de repetate ori în cromatografie de afinitate, fără să-și piardă proprietățile sale specifice.

Prezentat la redacție
la 15 iulie 1980

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de enzimologie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

ISOLIERUNG EINES NATÜRLICHEN α-CHYMOTRYPSIN-HEMMSTOFFES AUS SOYABOHNEN DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN TRÄGERFIXIERTEM α-CHYMOTRYPSIN

ZUSAMMENFASSUNG

Der aus Sojabohnenmehl durch Affinitätschromatographie an trägergebundenem α-Chymotrypsin isolierte α-Chymotrypsin-Hemmstoff erweist sich bei der Elektrophorese in Polyakrylamidgel als homogene Proteinfraktion mit relativ kleiner anodischer Wanderungsgeschwindigkeit und übt eine hemmende Wirkung sowohl auf die proteolytische, als auch auf die Esteraseaktivität des α-Chymotrypsins aus. Die proteolytische Aktivität wird stärker gehemmt, als die Esteraseaktivität, was auch durch die betreffenden K_i-Werte zum Ausdruck kommt. Das trägerfixierte Enzym reagiert in beiden Fällen weniger empfindlich auf den isolierten Hemmstoff.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, D. BĂNĂȚEANU, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 181(1981).
2. R. L. FOSTER, *The nature of enzymology*, Croom Helm, London, 1980, p. 127.
3. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
4. M. KUNITZ, J. gen. physiol., **30**, 291 (1947).
5. W. RICK, în *Methods of enzymatic analysis*, sub red. M. U. BERGMEYER, Academic Press, New York, 1965, p. 800.
6. G. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. biophys. Acta, **16**, 570 (1955).
7. P. C. W. HUMMEL, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
8. D. BĂNĂȚEANU, H. D. SCHELL, A. WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 21 (1981).
9. M. B. RHODES, N. BENNETT, R. E. FEENEY, J. biol. Chem., **235**, 1686 (1960).

INTERACŢIUNEA PLUMBULUI, ARSENULUI ŞI SELENIULUI ASUPRA GLUTATION-PEROXIDAZEI ŞI FORMĂRII LIPOPEROXIZILOR ÎN FICAT ŞI RINICHI LA ŞOBOLAN

MARIA CIUGUDEANU, SILVIA GABOR, ZOE ANCA, D. ROŞCA *

Rezumat. S-au urmărit acţiunea plumbului (200 ppm), a arsenului (25 ppm) şi a combinaţiilor lor, precum şi efectul protector al seleniului (0,5 ppm) faţă de aceste metale, asupra formării în exces de lipoperoxizi şi asupra activităţii glutation-peroxidazei (GSHpx) în ficat şi rinichi la şobolani.
S-a remarcat o relaţie între activitatea GSHpx şi nivelul peroxizilor lipidici în organele investigate. Seleniul a conferit un bun potenţial de apărare antioxidant la nivelul ficatului, faţă de acţiunea toxică a plumbului. Combinaţia arsen-seleniu s-a dovedit a influenţa favorabil capacitatea antioxidantă, exprimată prin creşterea activităţii GSHpx şi reducerea formării de lipoperoxizi.

Membranele celulare conţin cantităţi relativ crescute de acizi graşi polinesaturaţi, care sînt mai susceptibili la acţiunea unor promotori ai lipidperoxidării. Lipoperoxizii formaţi în exces exercită o acţiune toxică locală (1) drept rezultat al distrugerii acizilor graşi polinesaturaţi membranari, producîndu-se în final o necroză tisulară rapidă. Ei pot difuza departe de locul lor de formare, provocînd leziuni şi la nivelul ţesuturilor unde nu se formează, prin aceasta manifestînd o acţiune toxică sistemică generală (1).

Multiple cauze pot condiţiona sau facilita apariţia lor în exces : depleţia de glutation (2), depleţia de seleniu, deficitul în vitamina E (3), (4), (5), (6), (7), producerea de radicali liberi (8), (9), (10), acţiunea unor substanţe toxice (1), (11), (12), (13), (14).

Organismele vii dispun de mijloace de apărare faţă de peroxizii formaţi în exces în diferite procese fizico-chimice. Se menţionează glutation-peroxidaza (GSHpx), enzimă cu rol important în îndepărtarea surplusului de hidro- şi lipoperoxizi, simultan cu acţiunea ei asupra glutationului redus (GSH) (fig. 1) (3), (15). Activitatea GSHpx este dependentă de disponibilitatea în GSH şi de seleniul din organism, acesta din urmă fiind un constituent principal al GSHpx. Nivelul de GSH este menţinut prin reducerea glutationului oxidat (GSSG) cu ajutorul NADPH pe linia shuntului pentozofosfaţilor şi prin sinteza *de novo* de acid glutamic, cisteină, glicină. Aportul exogen de seleniu se corelează direct cu activitatea acestei enzime (5), (16), (17), (18) ; astfel, statusul nutriţional poate influenţa direct sau indirect capacitatea de apărare antioxidantă (3).

* Asistenţa tehnică : Viorica Coman.

În acest context ne-am propus să urmărim acţiunea plumbului, a arsenului şi a combinaţiilor lor, precum şi efectul protector al seleniului faţă de aceste metale, asupra formării lipoperoxizilor în exces, asupra activităţii GSHpx din ficatul şi rinichiul de şobolan.

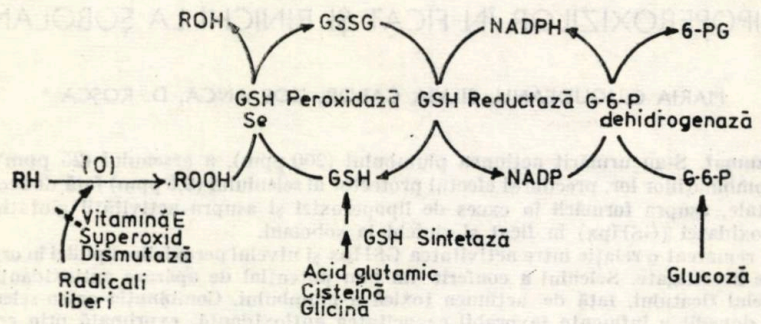


Fig. 1. — Sisteme antioxidante de apărare (după Chow): RH — acizi polinesaturaţi; ROOH — hidroperoxizi ai acizilor graşi; ROH — acizi graşi hidroxilaţi; GSH — glutation redus; GSSG — glutation oxidat; G-6-P — glucozo-6-fosfat; Se — seleniu; 6-PG — 6-fosfogluconat.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au luat în experiment 42 de şobolani masculi, în greutate de 140—160 g, care au fost trataţi după cum urmează: plumb (acetat) 200 ppm, arsen (arsenit de sodiu) 25 ppm, seleniu (selenit de sodiu) 0,5 ppm, plumb (200 ppm)+arsen (25 ppm), plumb (200 ppm) + seleniu (0,5 ppm), arsen (25 ppm) + seleniu (0,5 ppm) şi un lot formînd martorii. Metalele au fost administrate prin sondă intragastric în apa de băut. După 4 săptămîni, animalele au fost sacrificate; s-au prelevat rinichiul şi ficatul, organe din care au fost determinate activitatea glutation-peroxidazei (19) şi concentraţia de lipoperoxizi (20).

Rezultatele obţinute au fost calculate statistic prin testul „t" Student şi reprezentate grafic în valori procentuale faţă de martor [1].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Figura 2 redă activitatea glutation-peroxidazei şi valorile lipoperoxizilor din ficat şi rinichi la animalele tratate cu plumb, cu seleniu, precum şi cu combinaţiile lor.

La animalele la care s-a administrat seleniu 0,5 ppm, a rezultat o creştere semnificativă faţă de martor a activităţii GSHpx atît în ficat cît şi în rinichi şi o scădere a lipoperoxizilor. Concentraţia de seleniu, evaluată indirect prin activitatea GSHpx, este mult mai mare în ficat decît în rinichi.

Administrarea plumbului în cantitate de 200 ppm a provocat o creştere semnificativă la nivelul ficatului şi o creştere a lipoperoxizilor faţă de martor. În cazul rinichilor, activitatea GSHpx este semnificativ scăzută faţă de

[1] Dorim să aducem şi pe această cale mulţumiri tovarăşului dr. R. Olinescu, Clinica radiologică Fundeni, pentru ajutorul material acordat.

martor, ceea ce implicit a condus la un exces semnificativ de lipoperoxizi. În acest caz, plumbul a inhibat activitatea GSHpx, inhibiție ce este competitivă pentru GSH (21). Datorită acestui fapt, lipoperoxizii formați în exces nu au fost îndepărtați, GSHpx neavînd substrat. Toxicitatea mai

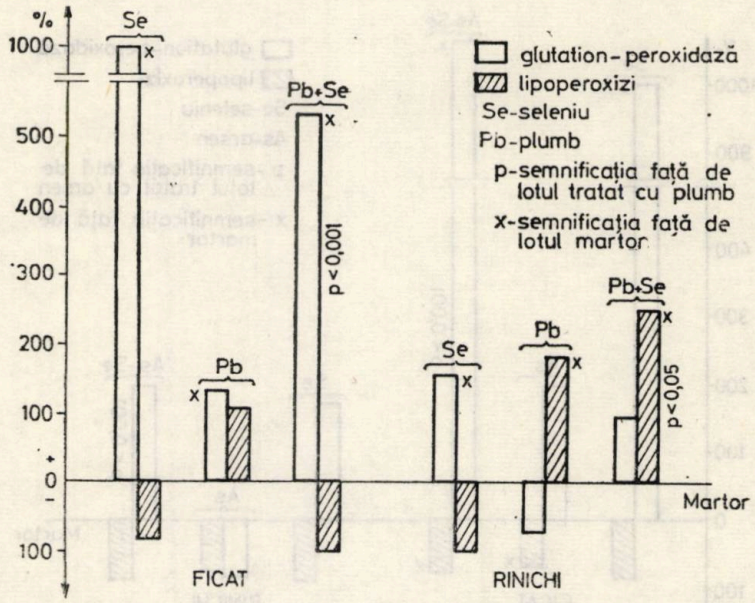


Fig. 2. — Lipoperoxizii și activitatea GSHpx în ficat și rinichi la șobolan sub acțiunea seleniului, plumbului și a asocierii lor.

scăzută exercitată de plumb la nivelul ficatului comparativ cu rinichiul, sub aspectul inducerii excesive de lipoperoxizi, s-ar datora unor posibile mecanisme de detoxifiere față de plumb la nivelul acestui organ (22), rinichiul fiind prejudiciat sub acest raport.

Combinația plumb + seleniu ilustrează efectul stimulator al seleniului asupra GSHpx din ficat, cauzînd o creștere semnificativă a activității atît față de martor, cît și în raport cu lotul de animale tratate numai cu plumb. Ca urmare, rezultă o scădere semnificativă a lipoperoxizilor din ficat. În cazul rinichilor s-a remarcat o creștere semnificativă a lipoperoxizilor față de martor și de lotul de animale tratate cu plumb, GSHpx menținîndu-se la valori scăzute. La nivelul acestui organ, seleniul nu poate contracara toxicitatea plumbului, ceea ce sugerează presupunerea că seleniul nu este competitiv cu plumbul pentru proteinele din țesutul renal ce conțin sulf.

Cerklewski și Forbes (23) constată o scădere a concentrației de seleniu în rinichi sub acțiunea plumbului, consecință fie a inhibării consumului de seleniu, fie a afectării distribuției tisulare a seleniului. Raportul Pb/Se, găsit de autori diferit în rinichi (1 : 1) față de ficat (12 : 1), sprijină ideea lipsei efectului protector al seleniului la nivelul rinichiului.

În concluzie, efectul protector al seleniului ca antioxidant faţă de toxicitatea plumbului, monitorizat prin activitatea GSHpx ce intervine în îndepărtarea lipoperoxizilor formaţi în exces, este limitat şi condiţionat de organul cercetat (ficat sau rinichi).

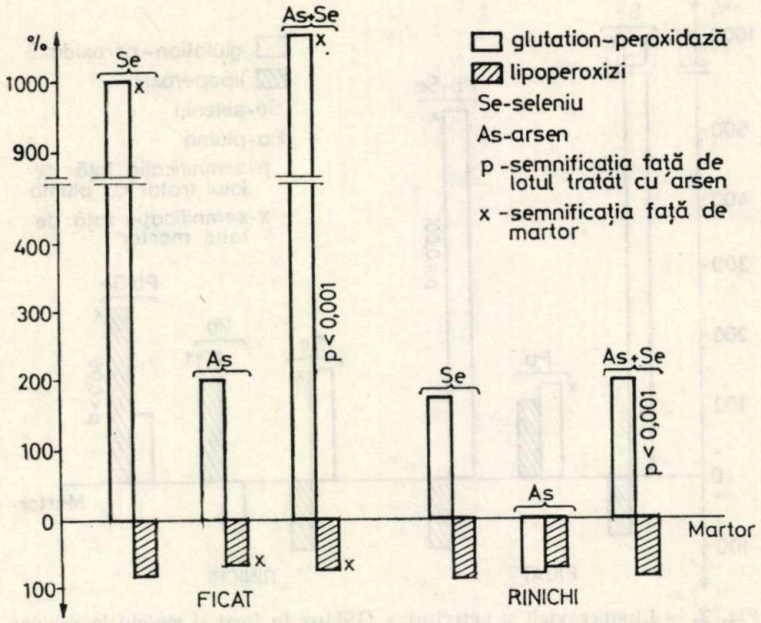


Fig. 3. — Lipoperoxizii şi activitatea GSHpx în ficat şi rinichi la şobolan sub acţiunea arsenului, seleniului şi a asocierii lor.

În figura 3 redăm, procentual faţă de martor, activitatea glutation-peroxidazei şi valorile lipoperoxizilor din ficat şi rinichi la şobolanii trataţi cu arsen, seleniu şi prin combinaţia lor. Administrarea de arsen (25 ppm) a provocat în ficat o creştere a activităţii GSHpx şi o scădere semnificativă a lipoperoxizilor. Combinaţia arsen + seleniu a condus la o creştere semnificativă a GSHpx atît faţă de martor, cît şi faţă de animalele tratate cu arsen. Acţiunea celor două metale se însumează, ducînd la o creştere marcată a enzimei şi la un bun potenţial de apărare antioxidantă. La nivelul rinichiului (fig. 3) se observă o scădere a activităţii GSHpx şi a lipoperoxizilor la lotul tratat cu arsen. La nivelul acestui organ, arsenul inhibă activitatea GSHpx, ca şi plumbul, fiind posibilă o competiţie între seleniu şi arsen pentru grupările SH. Combinaţia arsen + seleniu a cauzat o creştere semnificativă a activităţii GSHpx renale faţă de martor la lotul tratat cu arsen.

În concluzie, combinaţia arsen + seleniu în dozele administrate constituie un stimul pentru activitatea GSHpx atît la nivel hepatic cît şi renal, concentraţia lipoperoxizilor fiind scăzută.

În cazul combinaţiei plumb + arsen (fig. 4) se observă o stimulare a activităţii GSHpx hepatice şi o inhibare a activităţii acesteia la nivel

renal, ceea ce duce la modificarea semnificativă a nivelelor de lipoperoxizi în sensul opus al activității enzimatice.

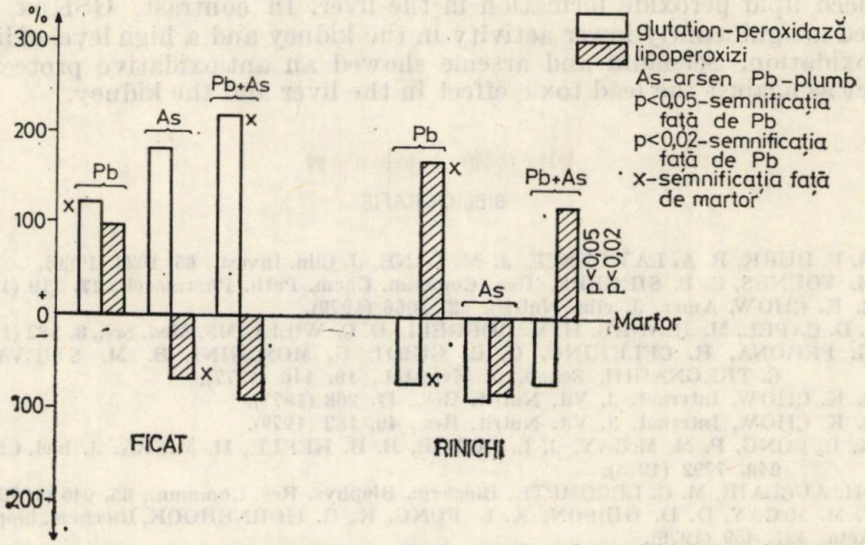


Fig. 4. — Lipoperoxizii și activitatea GSHpx în ficatul și rinichiul de șobolan sub acțiunea plumbului, arsenului și a asocierii lor.

CONCLUZII

Se remarcă o relație între activitatea GSHpx și nivelul peroxizilor lipidici în organele cercetate la toate cele trei metale.

Se relevă efectul protector antioxidant al seleniului și al arsenului față de plumb la nivelul ficatului. Acest efect a fost observat și în cazul rinichiului. Asocierea arsenului cu seleniul duce la o stimulare a activității GSHpx hepatice și renale, oferind un bun potențial antioxidant de apărare.

Prezentat la redacție
la 11 mai 1981

Institutul de igienă și sănătate publică
și
Facultatea de biologie,
Universitatea „Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca

LIPID PEROXIDES AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN THE LIVER AND THE KIDNEY OF LEAD, ARSENIC AND SELENIUM TREATED-RATS

SUMMARY

Male rats were given, for 30 days daily, intragastrically in the drinking water, lead (200 ppm), arsenic (25 ppm) and selenium (0.5 ppm), singly and in combination. Lipid peroxides and glutathione peroxidase

(GSHpx) activity were measured in the liver and the kidney. A relationship between GSHpx and lipid peroxide levels was evident. The treatment of rats with lead produced a significant increase of GSHpx and a reduced lipid peroxide formation in the liver. In contrast, GSHpx disclosed a significantly lower activity in the kidney and a high level of lipid peroxidation. Selenium and arsenic showed an antioxidative protective effect as against the lead toxic effect in the liver and the kidney.

BIBLIOGRAFIE

1. R. F. BURK, R. A. LAWRENCE, J. M. LANE, J. Clin. Invest., **65**, 1024 (1980).
2. M. YOUNES, C. P. SIEGERS, Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., **27**, 119 (1980).
3. C. K. CHOW, Amer. J. clin. Nutrit., **32**, 1066 (1979).
4. I. D. CAPEL, M. JENNER, H. M. DORRELL, D. C. WILLIAMS, Med. Sci., **8**, 382 (1980).
5. G. PERONA, R. CELERINO, G. C. GUIDI, G. MOSCHINI, B. M. STIEVANO, C. TREGNAGHI, Scand. J. Hematol., **19**, 116 (1977).
6. C. K. CHOW, Internat. J. Vit. Nutrit. Res., **47**, 268 (1977).
7. C. K. CHOW, Internat. J. Vit. Nutrit. Res., **49**, 182 (1979).
8. K. L. FONG, P. M. McCAY, J. L. POYER, B. B. KEELE, H. MISRA, J. biol. Chem., **248**, 7792 (1973).
9. CH. AUCLAIR, M. C. LECOMPTE, Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 946 (1978).
10. P. M. McCAY, D. D. GIBSON, K. L. FONG, K. R. HORNBROOK, Biochem. biophys. Acta, **431**, 459 (1976).
11. S. GABOR, T. FRITS, Z. ANCA, E. ZUGRAVU, Arch. Mal. prof., **32**, 553 (1971).
12. S. GABOR, Z. ANCA, Int. Arch. Arbeitsmed., **32**, 327 (1974).
13. S. GABOR, Z. ANCA, E. ZUGRAVU, Arch. Environm. Hlth, **30**, 499 (1975).
14. S. GABOR, Z. ANCA, E. ZUGRAVU, M. CIUGUDEANU, B. BÖHM, *The in vitro effects of mineral dusts*, sub red. R. C. BROWN, M. CHAMBERLAIN, R. DAVIES, I. P. GORMELY, Academic Press, New York, 1980, p. 131.
15. R. OLINESCU, S. NIŢĂ, Rev. roum. Biochim., **11**, 121 (1974).
16. K. G. THOMPSON, A. J. FRASER, B. M. HARROP, J. A. KIRK, Res. Vet. Sci., **28**, 321 (1980).
17. S. GROSS, Seminars in Hematol., **13**, 187 (1974).
18. P. D. WHANGER, P. H. VESWIG, J. A. SCHMITZ, J. E. OLDFIELD, J. Nutrit., **107**, 1298 (1977).
19. E. BEUTLER, O. DURON, B. M. KELLY, J. Lab. Clin. Med., **61**, 882 (1963).
20. F. SERAFINI, C. CESSI, Med. Speriment, **118**, 317 (1978).
21. A. G. SPLITTGERBER, A. L. TAPPEL, Arch. Biochem. Biophys., **197**, 531 (1979).
22. E. R. RAMSTOEK, W. G. HOEKSTRA, H. E. GANTHER, Toxicol. Appl. Pharmacol., **54**, 251 (1980).
23. F. L. CERKLEWSKI, R. M. FORBES, J. Nutrit., **106**, 778 (1976).

IDENTIFICAREA GAZCROMATOGRAFICĂ A UNOR STEROIZI URINARI IMPLICAŢI ÎN MEDICAŢIA ANABOLIZANTĂ

R. CIUPE*, SILVIA GABOR*, E. FĂGĂRĂŞAN**, L. POP**

Rezumat. Lucrarea tratează posibilitatea determinării componentei hormonale androgene anabolizante (NAPOSIM) din urină, incriminată într-o medicaţie energogenă, trofotropă. Posibilitatea evidenţierii s-a extins pînă în a 9-a zi după încetarea tratamentului.
Din determinările efectuate pe două loturi de cîte 10 persoane de fiecare sex s-a constatat o afectare a secreţiei de androgeni proprii după administrarea prelungită de hormoni anabolizanţi.

Efortul profesional raţional şi efortul sportiv limitat implică o refacere spontană, naturală. O activitate intensă profesională sau sportivă care depăşeşte efortul psiho-fizic obişnuit nu poate fi separată de o refacere dirijată, optimizată (1), cu utilizarea tuturor mijloacelor avansate, printre care şi cele farmacologice. Acestea conduc la accelerarea proceselor de restabilire sau la susţinerea biologică a efortului prin efectele trofotrope energogene sau anabolizante. Delimitarea strictă a produselor farmacologice de refacere şi a celor susţinătoare de efort se realizează numai în ceea ce priveşte mecanismul de acţiune. În lucrarea de faţă ne ocupăm de substanţele cu proprietăţi anabolizante de natură hormonală a căror acţiune este intercondiţionată.

Hormonii androgeni mediază utilizarea directă a glicogenului la nevoile energetice ale celulei musculare şi sînt direct implicaţi în biosinteza proteinelor celulare. Totodată, proteinele realizează hemocrinia hormonilor steroizi prin complecşii hormono-proteici. Astfel, un deficit proteic realizat printr-un consum excesiv energetic afectează direct, pe lîngă energetica celulară, şi transportul hormonal în organism. Invers, o deficienţă hormonală androgenă de tip testosteronic induce o biosinteză proteică deficitară, implicînd, pe lîngă alte efecte cunoscute, rezervele energetice celulare şi însuşi transportul hormonal.

Dintre substanţele cu efecte anabolizante se remarcă derivaţii testosteronului, care prin mici modificări structurale au condus la obţinerea unor medicamente, ca MADIOL, NAPOSIM, DIANABOL, STERANABOL, DECA-DURABOLIN etc., avînd acţiune virilizantă minimă (2).

În general se admite intervenţia derivaţilor testosteronului în metabolismul proteic, la încorporarea aminoacizilor în ribozomi şi în activitatea sintezei acizilor ribonucleici. Unele date experimentale confirmă mărirea fluxului de K^+ prin membrane biologice datorită stimulării ATP-azei microzomilor (3), precum şi stimularea activităţii enzimelor participante la metabolismul proteic şi la transportul aminoacizilor prin membrană.

St. cerc. biochim., 24, 2, 149—155 (1981)

Identificarea hormonilor steroizi androgeni naturali şi a celor sintetici administraţi este necesară în două scopuri :

— realizarea unei metodologii de control a administrării abuzive, cunoscînd faptul că utilizarea acestora în scop de obţinere a unor performanţe sportive superioare este interzisă în activitatea competiţională;

— urmărirea afectării secreţiei hormonale naturale proprii prin efect feed-back, datorat supraconcentraţiei de hormon androgen, realizată prin administrare medicamentoasă.

Regăsirea unor metaboliţi specifici sau a medicamentului propriuzis în urină după administrarea controlată a unor hormoni anabolizanţi constituie o preocupare constantă începînd din anul 1960 (4), cînd a devenit evidentă tendinţa de utilizare abuzivă a anabolizanţilor de sinteză. Tehnica gazcromatografică, prin capacităţile sale separatorii inegalabile, este aplicată cu precădere în asociaţie cu spectrometria de masă (5), (6), (7) în determinări analitice de cercetare (7), expertiză şi control (8). Lucrările lui Donike (9) — (12), precursor în lupta împotriva „dopingului" în competiţiile sportive, precum şi cele ale lui Horning şi Horning (13) şi Trocha şi D'Amato (14), constituie o bază în elaborarea metodologiei experimentului prezent.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru a reduce nenumăratele particularităţi specifice individuale ale compoziţiei hormonale urinare, s-a preconizat obţinerea unor „profile" hormonale pe sexe ale componentelor permanente şi majoritare. După obţinerea acestor „profile", prin administrarea controlată de METANDIENON (NAPOSIM, DIANABOL, NEROBOL) s-au identificat componentele nou apărute pe cromatogramă, amplificate sau, dimpotrivă, diminuate de administrarea experimentală. Etapa următoare a constat în urmărirea restabilirii în timp a „profilului" urinar hormonal iniţial după încetarea administrării.

S-au utilizat două loturi, diferenţiate pe sexe, a cîte 10 persoane fiecare, în scopul stabilirii profilului hormonal specific. Determinările individuale au relevat diferenţe foarte mari între indivizii aceluiaşi sex, precum şi între sexele opuse. Utilizarea unei cromatograme ca profil urinar pentru un grup este astfel exclusă în situaţia determinărilor cu scop de cercetare. În vederea reducerii variabilelor individuale, s-au amestecat extractele individuale ale grupului masculin, obţinîndu-se cromatograma din figura 1, *a*, şi ale celui feminin (fig. 1, *b*), ilustrate comparativ.

Pentru identificarea NAPOSIMULUI s-a utilizat un lot de 10 sportivi activi, de performanţă, cărora li s-au administrat zilnic 0,02 mg, timp de 30 de zile. Cromatograma din figura 2 ustrează apariţia, pe locul pickului nr, 22, a unei componente accentuate după prima zi de administrare.

Determinarea efectuată în a 9-a zi după încetarea administrării indică în poziţia 22 un pick remarcabil (fig. 3), ceea ce ne îndreptăţeşte să afirmăm dispariţia lentă a compusului hormonal din urină corespunzător NAPOSIMULUI administrat. Amestecul de probe determinat în prima zi şi după 30 de zile de administrare a fost comparat în scopul evidenţierii unor eventuale modificări în profilul hormonal masculin.

Extracţia şi derivatizarea s-au efectuat ţinîndu-se seama de lucrări anterioare cu preocupări similare (15), (16), (17).

Extracția. La 20 ml urină (se centrifughează în caz de turbiditate) se adaugă 2 ml tampon acetat (pH 4,6) și se stabilește un pH de 5 prin adaos de soluție NaOH 1 M. Se adaugă 30 ml glucuronidază, după care se menține la 55°C pe baie de apă timp de 2 ore. Se răcește și apoi se centrifughează. După adăugarea a 2 ml tampon carbonat, se aduce la pH 8,6—9. Se extrage cu 3 porțiuni de eter etilic liber de peroxizi (20 ml, 30 ml și, respectiv, 10 ml) prin agitare timp de 10 minute cu un agitator orizontal. Eterul și gelul respectiv format se cumulează, extrăgîndu-se și acest gel cu încă 5 ml eter etilic timp de 10 minute. Eterul rezultat, fără să mai conțină gel sau urină, se evaporă într-un pahar Berzelius de 50 ml formă înaltă la 45°C cu barbotare de azot (pahar cu închidere etanșă) pînă la aproximativ 1 ml. Se continuă evaporarea cu barbotare de azot pînă la consistență vîscoasă.

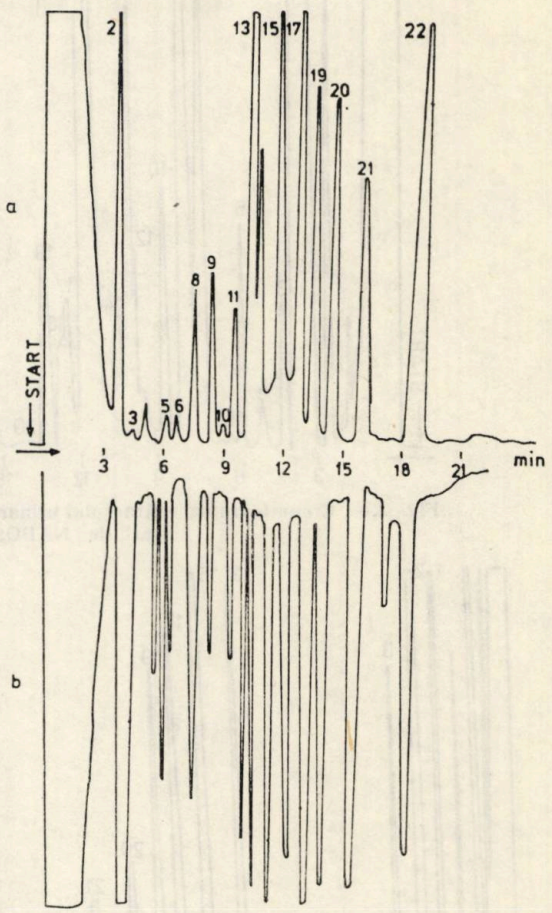


Fig. 1. — Separarea hormonilor steroizi urinari la lotul de femei (*a*) și de bărbați (*b*).

Derivatizarea. Se adaugă 0,02 ml amestec de silanizare (firma Pierce), constituit din 100 de părți BTSA (N,O-bis-trimetilsilil-acetamidă), 10 părți TMGS (trimetil-clorsilan), 5 părți TSIM (N-trimetil-sililimidazol), după care se menține bine închis timp de 30 de minute la 55°C. Se injectează în aparat 5 μl din produsul obținut.

Parametrii gazcromatografici utilizați au fost preluați din lucrări anterioare, cu rezultate convenabile atît în ceea ce privește timpul de execuție, cît și rezoluția componentelor separate (15).

Aparat : Carlo Erba GD-ACI
Coloană : sticlă silanizată 1,8 m cu diametrul de 6 × 4 mm
Faza staționară : OV — 225,3% pe Chromosorb W silanizat 80—100 mesh

Temperatura programată : între 160 şi 270°C cu 8°C/min
injector 250°C
detector 250°C
Debit gaz : purtător N_2 — 20 ml/min
Detector : FID dublu

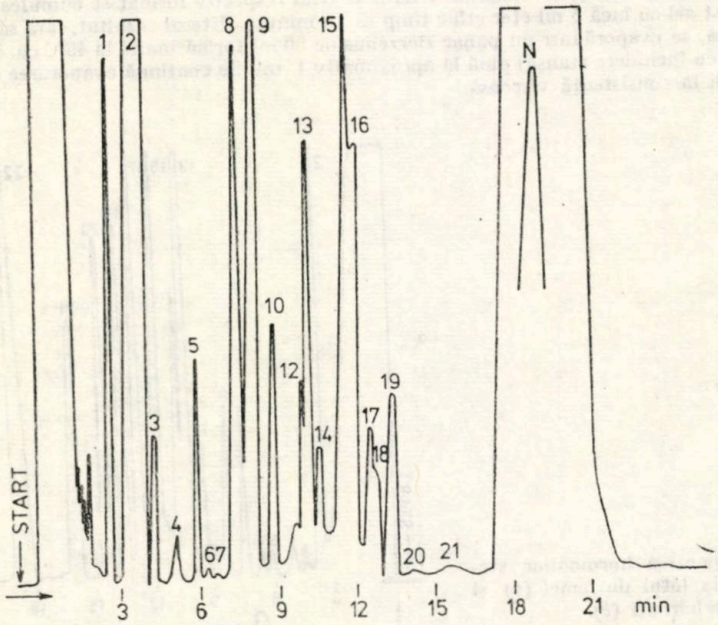


Fig. 2. — Cromatograma extractului urinar după prima zi de administrare de NAPOSIM.

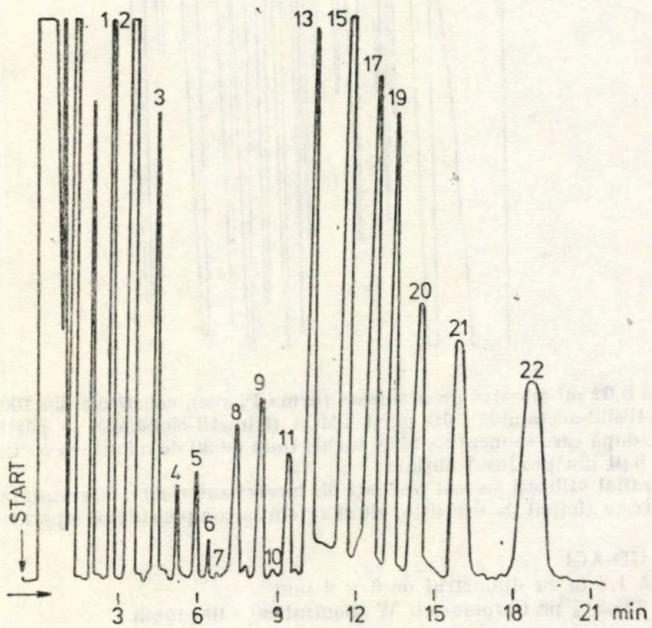


Fig. 3.— Cromatograma extractului urinar după a 9-a zi de la încetarea administrării de NAPOSIM.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cromatogramele evidenţiază o mare varietate de componente urinare. S-au identificat 9 hormoni steroizi şi metaboliţi din 22 de componente separate (tabela 1), utilizîndu-se etaloane puse la dispoziţie de Institutul de chimie din Cluj-Napoca.

Tabela 1

Hormonii steroizi identificaţi în extractele urinare şi parametrii lor caracteristici

Nr. crt.	Nr. de pe cromatogramă	Compusul	Timpul de reţinere absolut (R_t) (min)
1	2	Pregnandiol	3,7
2	5	Androsteron	5,9
3	6	Etiocolanolol	6,4
4	8	Dehidroepiandrosteron	7,5
5	13	Pregnantriol	10,2
6	17	11-Cetoandrosteron	12,5
7	19	11-Cetoetiocolanolol	13,4
8	21	11-OH-Androsteron	15,7
9	22	Metandienon, NAPOSIM (testosteron)	18,8

Apariţia pickului nr. 22, deosebit de accentuată după administrarea NAPOSIMULUI, simplifică problema expertizării în utilizarea acestuia chiar pînă la a 9-a zi după sistarea medicaţiei. Varietatea mare de profiluri hormonale individuale nu a permis generalizarea pe sexe decît după amestecarea probelor provenite de la subiecţi de acelaşi sex, care realizează accentuarea componentelor comune şi autodiluţia celor singulare. Pentru studiul implicaţiilor hormonale se recomandă sau un lot numeros sau ca fiecare individ să fie şi martorul propriu înainte de administrare. Este indicată confirmarea prin spectrometrie de masă a identităţii pickului din poziţia 22 şi a altora, pentru a stabili dacă aceasta este nemodificată sau, dimpotrivă, reprezintă un metabolit al componentei de bază, NAPOSIMUL.

Apariţia după prima zi de administrare şi regăsirea după a 9-a zi de la încetarea administrării a NAPOSIMULUI în urină indică eliminarea rapidă a compusului şi reţinerea unei fracţiuni timp îndelungat în organism, probabil sub formă de complex proteino-hormon, limitarea în timp nefiind stabilită încă.

Compararea cromatogramelor obţinute prin amestecul probelor individuale a 10 sportivi înainte de administrarea NAPOSIMULUI şi după 30 de zile de administrare a relevat scăderea pronunţată a unor semnale corespunzătoare androsteronului şi, respectiv, pregnandiolului şi creşterea 11-OH-androsteronului şi a 11-cetoetiocolanololului. Dintre hormonii steroizi consideraţi cu implicaţii certe în activitatea androgen-anabolică menţionăm în primul rînd testosteronul, metabolitul său primar de oxidare fiind Δ^4-androsten-3,17-diolul. Dintre C-19-steroizii izolaţi din urină umană normală şi patologică se consideră legaţi de metabolismul testosteronului

următorii : androsteron, 5 β-androsteron, epiandrosteron, androstan-3,17-dion,5 β-androstan-3, 17-dion, dehidroepiandrosteron, Δ^5-androsten-3β,16α, 17 β-triol, Δ^5-androsten-3 β, 17α-diol, androstan-3 β-01-16 one, androstan-3α, 17 β-diol, 5 β-androstan-3α, 17 β-diol.

În urină s-au evidenţiat şi o serie de C-11 compuşi oxigenaţi ca posibili cataboliţi ai androgenilor, de origine suprarenală. Unii sînt inactivi, alţii au activitate androgenică. Dintre aceştia se remarcă androstan-3α, 11 β-diol-17 one.

Scăderea semnificativă a androsteronului, precum şi creşterea 11-OH-androsteronului implică o inhibare a secreţiei de derivaţi ai androstanului printr-un efect de feed-back, inhibare cauzată de administrarea în exces a derivaţilor de testosteron.

CONCLUZII

1. S-a realizat identificarea NAPOSIMULUI în urină, la subiecţi efectuînd o activitate sportivă, după o întrerupere de 9 zile a administrării.
2. Se constată o inhibare a secreţiei unor hormoni (androsteron, pregnandiol), şi creşterea unor metaboliţi.
3. Lucrarea evidenţiază ipoteza afectării secreţiei normale de hormoni androgeni la subiecţii la care s-a administrat NAPOSIMUL. Se pune problema cercetării hormonilor afectaţi şi a reversibilităţii fenomenului.

Prezentat la redacţie
la 31 martie 1981

* *Institutul de igienă şi sănătate publică, Cluj-Napoca, Laboratorul de medicina muncii*
şi
** *Institutul de medicină şi farmacie, Cluj-Napoca*

GAS CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF URINARY STEROIDS USED AS ANABOLISANTS

SUMMARY

The possibility of gas chromatographic determination of an androgenic anabolisant hormonal compound (NAPOSIM) in urine is presented. The presence of the compound used as an energogenic, trophotropic drug was found in urine up to the 9th day after the withdrawal. A modification of the androgenic secretion has been observed in two groups consisting of ten women and ten men, following the hormonal prolonged administration.

BIBLIOGRAFIE

1. I. DRĂGAN, *Refacerea organismului după efort*, Edit. Sport-Turism, Bucureşti, 1980.
2. G. S. BĂCANU, LUCIA ANGELESCU, V. ŞERBAN, *Medicaţia metabolică*, Edit .medicală, Bucureşti, 1978.

3. A. D. ABRAHAM, *Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi*, Edit. Academiei, București, 1975.
4. J. E. LOVELOCK, S. R. J. LIPSKI, J. amer. Chem. Soc., **82**, 431 (1960).
5. M. SURACE, P. POLVANI, *La gas-cromatografia degli steroidi ormonali nell'indogine clinica*, Annali di Ostetrica e Ginecologica, Suppl. **12** (1967).
6. R. SCHOLLER, M. F. JOYLE, *Gas-chromatography of hormonal steroids*, Dunod, Paris ; Gordon and Breach, New York, 1967.
7. V. TOMAS, T. BOITOR, *Hormonii și funcțiile lor biochimice*, Edit. Ceres, București, 1977.
8. K. B. EIK-NES, E. C. MORNING, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1968.
9. M. DONIKE, Sportartzt und Sportmedizin, **1**,1(1975), **2**, 27 (1970), **2**, 32 (1972).
10. M. DONIKE, Farmaceutisch Tijdschrift voor Belgie, **55**,3 (1972).
11. M. DONIKE, Artzliche Praxis, **28**, 98 (1976).
12. M. DONIKE, Medizinische Technik, **92**,4 (1972).
13. E. C. HORNING, M. G. HORNING, J. Chromatog. Sci., 129 (1971).
14. P. TROCHA, N. A. D'AMATO Clin. Chem., **24**, 193 (1978).
15. E. BAILEY, M. FENOUGHTY, J.-R.-CHAPMAN, J. Chromatog., **96**, 33 (1974).
16. * * * Short Notes : *Steroid Analysis*, Carlo Erba, Strumentazione.
17. ERNEST JUCKER, *Progress in Drug Research*, vol. 2, Birkhauser-Verlag, Basel, 1960.

COMPORTAREA SORBITOLDEHIDROGENAZEI ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE, M. ŞERBAN

Rezumat. Diabetul experimental de tip aloxanic determină modificări semnificative ale activităţii sorbitoldehidrogenazei hepatice.
Comparativ cu lotul martor, în diabetul aloxanic activitatea specifică hepatică a sorbitoldehidrogenazei creşte pînă la 368,7%. Sînt discutate implicaţiile biochimice şi patologice datorate modificării activităţii acestei enzime.

Pe lîngă glucoză, fructoza constituie una din ozele cele mai importante ale organismului uman, ea putîndu-se integra în fluxul căii metabolice glicolitice. Pe de altă parte, în diabetul zaharat se remarcă o acumulare excesivă de sorbitol, ca urmare a creşterii activităţii sorbitoldehidrogenazei (EC 1.1.1.21). Enzima poate fi considerată de origine hepatică, datorită faptului că raportul activităţii sorbitoldehidrogenazei pentru diverse ţesuturi este ficat/rinichi/prostată = 250/50/1, activitatea fiind practic nulă în celelalte ţesuturi (1).

Între hiperglicemie şi acumularea de sorbitol există o proporţionalitate directă. În aceste condiţii se constată apariţia de leziuni intracelulare de tip hidroosmotic cu vacuolizări, în special în ţesuturi în care glucoza difuzează, cum ar fi retina, cristalinul, celulele pancreatice, tecile Schwann, peretele arterelor mari etc. Efectul este atribuit unei stări de polioltoxicoză, în care se presupune că sînt implicate cele două enzime importante din metabolismul fructozei, şi anume aldozreductaza şi sorbitoldehidrogenaza (2), (3). În creier şi în lichidul cefalorahidian, sistemul enzimatic evoluează în sensul transformării glucozei în fructoză, contribuind la creşterea concentraţiei fructozei la aceste niveluri (4).

Activitatea sorbitoldehidrogenazei este crescută, ca o consecinţă a unor tulburări hepatice, care sînt asemănătoare celor întîlnite în diabetul zaharat. De altfel, diabetul zaharat este de multe ori secundar afecţiunilor hepatice (5). Pe baza acestor premise şi ca o continuare a cercetărilor noastre anterioare referitoare la modificările biochimice induse de diabetul aloxanic (6), (7), în această lucrare ne-am propus ca obiectiv stabilirea comportării activităţii sorbitoldehidrogenazei în ficatul animalelor cărora li s-a provocat diabet aloxanic.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe şobolani masculi din rasa Sprague Dowley în vîrstă de 6—8 luni şi cu o greutate cuprinsă între 225 şi 335 g. Experienţele s-au efectuat pe două loturi, constituite din cîte 10 şobolani : un lot normal şi un lot la care s-a produs experimental diabet aloxanic. Inducerea dia-

betului aloxanic s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de aloxan de 12,5 mg/100 g corp în soluţie tampon fosfat-citrat de pH 3,5. Determinarea glicemiei a relevat o manifestare trifazică ; s-a considerat că şobolanii sînt în stare diabetică din momentul în care s-a instalat o fază de hiperglicemie cu valori cuprinse între 450 şi 650 mg glucoză/100 ml plasmă. Animalele au fost sacrificate prin exsanghinare cardiacă, prelevîndu-se sîngele şi ficatul. Sîngele a fost recoltat pe heparină, iar din plasma obţinută prin centrifugare s-a dozat glucoza prin metoda cu ortotoluidină (8) ; valorile glicemiei s-au exprimat în mg glucoză la 100 ml plasmă. Ficatul prelevat a fost spălat repetat cu ser fiziologic la rece şi ulterior omogenizat într-un omogenizator Potter, în soluţie tampon TRIS — HCl de pH 7,4 ; raportul de extracţie a fost de 1 g ţesut la 3 ml soluţie tampon. Omogenatul a fost centrifugat la 5 000 × g şi la rece, timp de 30 minute. Supernatantul obţinut a fost diluat cu apă distilată în proporţie de 1/9, fiind astfel utilizat pentru dozarea activităţii enzimatice a sorbitoldehidrogenazei. Activitatea enzimei s-a determinat prin metoda spectrofotometrică (8), iar rezultatele au fost exprimate în micromoli fructoză/minut/gram proteină. Datele au fost prelucrate statistic şi comparate prin testul Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate valorile medii statistice şi abaterea standard a mediei activităţilor hepatice ale sorbitoldehidrogenazei.

Din analiza rezultatelor prezentate se constată o creştere intens semnificativă ($p < 0,001$) a activităţii sorbitoldehidrogenazei la lotul tratat cu aloxan în comparaţie cu lotul martor. Rezultă astfel că activi-

Tabela 1

Activitatea sorbitoldehidrogenazei hepatice pentru lotul normal şi cel cu diabet aloxanic

Probe	μM fructoză/min/g proteină	
	lot normal $\overline{X} \pm Sm$	lot tratat cu aloxan $\overline{X} \pm Sm$
Activitatea sorbitoldehidrogenazei	7,09±0,20	26,16±0,44
Testul Student	$t = 39,0901$	$p < 0,001$
Activitatea faţă de normal	—	368,7 %

tatea sorbitoldehidrogenazei înregistrează o creştere de 368,7% în ficatul animalelor cărora le-a fost indus diabet aloxanic, după cum reiese şi din figura 1.

Creşterea evidentă a activităţii sorbitoldehidrogenazei reprezintă încă un exemplu de activare a unei enzime în diabetul aloxanic, după cum am constatat şi în cazul altor enzime, ca fosfataza acidă (EC 3.1.3.2) (7) şi ornitincarboimiltransferaza (EC 2.1.3.3) (9). Aceste date experimentale, ca şi cele obţinute anterior, nu confirmă ipoteza emisă de Lazarow (citat de (10)) cu privire la caracterul tiol privat al aloxanului, cel puţin pentru anumite enzime.

Constatarea că activitatea sorbitoldehidrogenazei este mult crescută în hepatocit poate să explice o serie de tulburări în organism. Calea „poliol" a sorbitolului şi a fructozei reprezintă o alternativă de metabolizare devi-

ată a glucozei în starea de hiperglicemie generată ca urmare a deficitului de insulină (11). Sorbitolul și fructoza, acumulate intracelular, creează o hiperosmolaritate cu consecințele ei directe, manifestate prin hiperhidratarea celulară, prin degenerescența hidropică și, consecutiv, prin distrucția celulei.

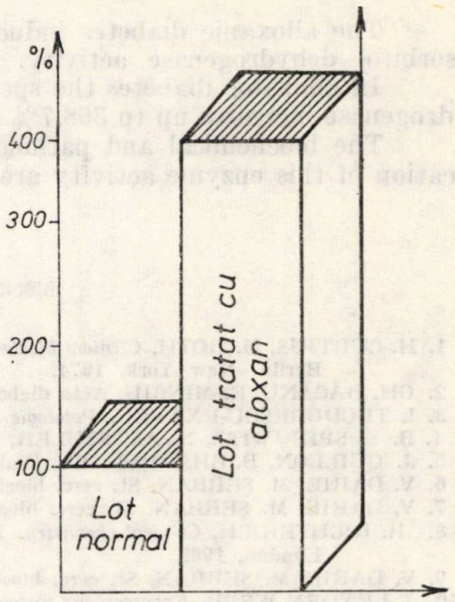


Fig. 1. — Activitatea sorbitoldehidrogenazei din ficat provenit de la șobolani normali și cu diabet aloxanic.

Unele complicații cronice ale diabetului zaharat sînt atribuite căii „poliol", ca, de exemplu, cataracta și retinopatia diabetică, demielinizarea segmentară la nivelul celulelor Schwann (neuropatia diabetică), acumularea de sorbitol la nivelul arterelor mari (macroangiopatia diabetică) (11), (12). Aceste complicații se pot explica și printr-o tulburare a transportului de sodiu și potasiu, care, după cum se știe, sînt implicate în transportul activ al glucozei în peretele membranei celulare (11), (12).

CONCLUZII

1. În diabetul aloxanic, activitatea sorbitoldehidrogenazei hepatice înregistrează o creștere evidentă de pînă la 368,7% față de lotul normal.

2. Creșterea activității sorbitoldehidrogenazei hepatice constituie încă o dovadă că ipoteza lui Lazarow cu privire la caracterul tiol privat al aloxanului nu are o aplicabilitate generală.

3. Alternativa patologică de metabolizare a fructozei poate explica apariția unor complicații cronice ale diabetului zaharat, ca retinopatia diabetică, neuropatia diabetică și macroangiopatia diabetică.

Prezentat la redacție
la 13 ianuarie 1980

Facultatea de medicină, Craiova,
Disciplina de biochimie,
și
Facultatea de medicină veterinară, București,
Disciplina de biochimie

SORBITOL DEHYDROGENASE IN ALLOXANIC DIABETES

SUMMARY

The alloxanic diabetes induces significant changes on the hepatic sorbitol dehydrogenase activity.

In alloxanic diabetes the specific hepatic activity of sorbitol dehydrogenase increases up to 368.7% as compared to the control.

The biochemical and pathological implications due to the modification of this enzyme activity are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. H. CURTIUS, M. ROTH, *Clinical biochemistry. Principles and methods*, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1974.
2. GH. BĂCANU, E. MINCIU, Acta diabetologica romana, **2**, *5—6*, 316 (1976).
3. I. TEODORESCU-EXARCU, *Patologie biochimică*, Edit. medicală, Bucureşti, 1974.
4. B. S. SPINOWITZ, N. ALTSZULER, Diabetes, **22**, *11*, 820 (1973).
5. J. GUILLON, B. CHARBONNEL, Diabète et metabolisme, **1**, 191 (1975).
6. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **22**, 11 (1979).
7. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **22**, 133 (1979).
8. R. RICHTERICH, *Clinical chemistry. Theory and practice*, Academic Press, New York—London, 1969.
9. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **24**, 57 (1981).
10. J. LEYDEN WEBB, *Enzymes and metabolic inhibitors*, Academic Press, New York — London, 1966.
11. I. MINCU, *Diabetul zaharat*, Edit. medicală, Bucureşti, 1977.
12. K. OBERDISSE, *Diabetes mellitus*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1975.

PEROXIDAREA LIPIDICĂ ÎN ATEROSCLEROZĂ

VERONICA DINU

Rezumat. S-au apreciat conţinutul de peroxizi lipidici şi concentraţia de tioli neproteici în sînge la subiecţi cu ateroscleroză în raport cu un lot de control. Concentraţia de peroxizi lipidici, estimată prin testul cu acid tiobarbituric, creşte semnificativ la lotul de aterosclerotici faţă de cel normal.
Concentraţia de tioli neproteici prezintă scăderi semnificative la bolnavii cu ateroscleroză faţă de grupul de control. Aceste modificări ar putea fi relevante în patogeneza sau agravarea leziunilor aterosclerotice.

Invocarea peroxidării lipidelor ca mecanism patogen în ateroscleroză (ATS) este de dată relativ recentă.

Datele din literatură se referă în special la ateroscleroza experimentală reprodusă la animale de laborator sau la studii efectuate pe plăci ateromatoase obţinute post-mortem de la subiecţi umani (1)—(6). Extrapolarea rezultatelor obţinute pe animale la om introduce, desigur, un procent mare de aproximaţie, iar creşterea peroxidării lipidelor, observată în aortele umane post-mortem, este considerată de către cei mai mulţi autori ca artefactuală (2).

Lucrarea de faţă apreciază implicarea peroxidării lipidelor în aterogeneza umană folosind ca material biologic sîngele, care poate fi prelevat şi lucrat rapid.

Prezenţa în sînge, cu precădere în membrana eritrocitară, a unor mari cantităţi de lipide polinesaturate face posibilă apariţia peroxidării lipidelor. Poolul redus de peroxizi în sîngele normal dovedeşte că formarea lor este limitată sau că, odată formaţi, există mecanisme eficiente de descompunere a lor (7), (8), (9). În limitarea peroxidării, iniţiată de oxigenul activ mai ales prin reducerea sa univalentă ($O_2 \rightarrow O_2^-$), un rol fundamental îl joacă superoxid-dismutaza (SOD), enzimă catalizînd descompunerea anionului superoxid (O_2^-) (7).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} H_2O + 1/2\,O_2$$

Sistemul enzimatic implicat major în descompunerea peroxizilor lipidici formaţi este reprezentat de către glutation-peroxidază (GPx), enzimă avînd glutationul redus (GSH) drept nucleofil acceptor specific (8). Reacţia catalizată de GPx, şi anume :

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O,$$

este cuplată *in vivo* cu reacţia glutation-reductazică şi cu shuntul pentozelor, generator de echivalenţi reducători necesari reacţiei de refacere a GSH (9).

Descompunerea neenzimatică a peroxizilor lipidici duce la formarea de malondialdehidă (MDA).

În prevenirea peroxidării, un rol important joacă de asemenea prezenţa unor antioxidanţi, ca tocoferolul, acidul ascorbic, carotenoizii (10).

Formarea excedentară a peroxizilor în sînge, însoţită de un mecanism pasiv de depunere a lor în peretele arterial, ar putea fi incriminată, alături de perturbări oxidative produse în însuşi peretele arterial, în instalarea sau cel puţin în agravarea leziunii ateromatoase.

În lumina acestor consideraţii, în lucrarea de faţă s-au apreciat concentraţiile de peroxizi lipidici şi cele de tioli neproteici — reprezentaţi esenţial de glutation — în sîngele bolnavilor cu ATS faţă de un lot martor. Peroxizii lipidici s-au evaluat prin concentraţia MDA, rezultată prin descompunerea neenzimatică a acestora şi prin metabolizarea tromboxanului A_2 (11), (12).

MATERIAL ŞI METODĂ

Experimentul s-a efectuat pe un lot de 40 de aterosclerotici de sex masculin şi pe un lot martor, constituit din 40 de subiecţi aparent sănătoşi, de acelaşi sex şi cu aceeaşi limită de vîrstă. Lotul de aterosclerotici a cuprins subiecţi cu angină pectorală, accident vascular cerebral şi infarct miocardic recent. Subiecţii din lotul martor nu au prezentat antecedente personale sau heredo-colaterale de afectare vasculară.

Din ambele loturi s-au exclus subiecţii cu afecţiuni în a căror patogenie s-ar putea invoca o patologie a radicalilor liberi (13).

Probele de sînge s-au prelevat prin puncţie venoasă, pe heparină. Determinările s-au efectuat imediat după recoltare pentru a preveni autooxidarea tiolilor şi a diminua la maximum peroxidarea *in vitro* a lipidelor.

Concentraţia de tioli neproteici s-a determinat prin metoda Beutler modificată de Sedlak şi Lynsday (14).

Pentru determinarea peroxizilor lipidici s-a utilizat testul cu acid tiobarbituric (TBA), care evaluează în fapt concentraţia de malondialdehidă (15). Între concentraţia de peroxizi lipidici şi cea de malondialdehidă există o relaţie de proporţionalitate directă.

REZULTATE

Din analiza rezultatelor se constată creşterea semnificativă statistic a concentraţiei de MDA la lotul cu ATS (tabela 1). Într-adevăr, în timp ce concentraţia MDA prezintă o valoare medie de 2,75 nM/ml la ateroscleroşi,

Tabela 1

Concentraţia peroxizilor lipidici în sîngele subiecţilor cu ATS comparativ cu un lot martor

Lotul	Nr. cazuri	Media valorilor (nM/ml)	S	t	P
Subiecţi ateroscleroşi	40	2,75	0,58	3,41	<0,001
Subiecţi martor	40	2,33			

subiecţii normali prezintă o medie de 2,33 nM/ml. Aşa cum arată şi curbele de repartiţie a valorilor aproximate prin histograme, aproximativ 70% din valorile individuale la lotul de control se situează în intervalul 1,5—2,5, în timp ce la subiecţii cu ATS se constată o concentrare a valorilor în intervalul 2,5—3,9 (fig. 1).

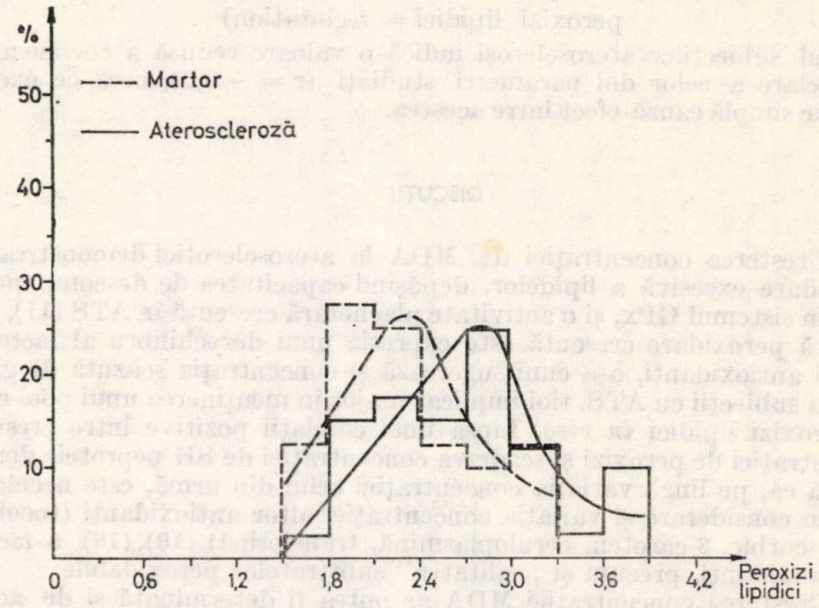


Fig. 1. — Histogramele repartiţiei valorilor peroxidazei la subiecţi normali şi ateroscleroşi.

Chiar dacă determinarea concentraţiei de peroxizi lipidici prin testul cu TBA este semicantitativă (deşi cea mai utilizată), ea reprezintă totuşi o indicaţie destul de fidelă a sensului schimbărilor concentraţiei de

Tabela 2

Concentraţia tiolilor neproteici în sîngele subiecţilor cu ATS comparativ cu un lot martor

Lotul	Nr. cazuri	Media valorilor (μM/ml)	S	t	P
Subiecţi ateroscleroşi	40	1,380	0,150	4,06	<0,001
Subiecţi martor	40	1,643	0,234		

endo- şi hidroperoxizi *in vivo*, permiţîndu-ne concluzia unei peroxidări necontrolate în ATS.

În ceea ce priveşte concentraţia tiolilor neproteici, aceştia scad semnificativ la bolnavii cu ATS faţă de lotul martor (tabela 2). Media valorilor pentru bolnavi este de 1,38 μM/ml, în timp ce pentru lotul de control este de aproximativ 1,64 μM/ml.

De notat distribuţia mai puţin omogenă a valorilor lotului de control faţă de valorile lotului de ateroscleroşi, explicabilă prin încadrarea în acest lot a unor subiecţi aparent sănătoşi. Turnoverul foarte mare al glutationului, sensibilitatea sa la starea de sănătate sau boală a organismului constituie explicaţia acestui fapt (13).

Analiza de regresie pentru funcţia

$$\text{peroxizi lipidici} = f(\text{glutation})$$

în cazul subiecţilor ateroscleroşi indică o valoare redusă a coeficientului de corelare a celor doi parametri studiaţi ($r = -0,3$), ceea ce exclude o relaţie simplă cauză-efect între acestea.

DISCUŢII

Creşterea concentraţiei de MDA la aterosclerotici demonstrează o peroxidare excesivă a lipidelor, depăşind capacitatea de descompunere a lor prin sistemul GPx, şi o activitate plachetară crescută în ATS (11), (12). Această peroxidare crescută este expresia unui dezechilibru al factorilor pro- şi antioxidanţi, aşa cum sugerează şi concentraţia scăzută de glutation la subiecţii cu ATS, tiol implicat major în menţinerea unui pool redus de peroxizi lipidici *in vivo*. Lipsa unei corelaţii pozitive între creşterea concentraţiei de peroxizi şi scăderea concentraţiei de SH neproteic demonstrează că, pe lîngă variaţia concentraţiei celui din urmă, este necesar să se ia în considerare şi variaţia concentraţiei altor antioxidanţi (tocoferol, acid ascorbic, β-caroten, ceruloplasmină, transferină) (10), (16), a factorilor prooxidanţi, precum şi „calitatea" substratelor peroxidabile.

Creşterea concentraţiei MDA ar putea fi determinată şi de activitatea trombocitară crescută, semnalată în ATS (17), biosinteza tromboxanilor, factori plachetari puternic agreganţi, fiind acompaniată de formarea acestei dialdehide (12).

Un argument în favoarea constatării noastre privind creşterea concentraţiei de peroxizi lipidici în sîngele pacienţilor cu ATS îl constituie observaţia recentă a lui Fogelman şi colab. (18) privind acumularea de esteri de colesterol în celulele încărcate cu lipide („foam cells") provenite din macrofage monocitare şi celule musculare netede cu proprietăţi macrofagice din leziunile ateromatoase. Creşterea conţinutului în esteri de colesterol al acestora se produce numai în cazul unei modificări a lipoproteinelor de densitate joasă prin interacţiunea prealabilă cu MDA. Răspunsul inflamator pe care îl induce acumularea de lipoproteine denaturate exagerează producerea de anion superoxid şi alte specii reactive de oxigen (radical hidroxil, oxigen singlet), întreţinînd propagarea lanţurilor radicalice de oxidare (19).

Formarea excesivă a peroxizilor lipidici în ATS are consecinţe dintre cele mai grave atît locale, la locul leziunii endoteliale aortice, cît şi generale. Peroxidarea lipidelor din membrane alterează selectivitatea acestora faţă de ioni şi diverşi metaboliţi prin modificarea arhitecturii lor şi prin introducerea de grupări peroxipolare în straturile duble lipidice, decuplează respiraţia de fosforilare, inactivează enzime cu grupări tiolice esenţiale (20), (21), (22). Mai mult, creşterea concentraţiei de MDA duce la formarea pigmenţilor lipofuscinici, compuşi de tip bază Schiff, făcînd posibile

procese de cross-linking la nivelul moleculelor proteice, de acizi nucleici şi fosfolipide, care îşi alterează astfel funcţionalitatea (20). De asemenea, MDA ar fi implicată în proliferarea celulelor musculare netede, alături de factorul mitogen al lui Antoniades (23).

Rezultatele noastre sprijină ipoteza rolului peroxidării lipidelor în instalarea aterosclerozei şi (sau cel puţin) în agravarea leziunilor ateromatoase.

CONCLUZII

1. Pacienţii cu ATS prezintă valori semnificativ crescute ale malondialdehidei, respectiv ale peroxizilor lipidici în sînge.

2. Concentraţiile de SH neproteic — esenţial glutation — sînt scăzute semnificativ la pacienţii cu ateroscleroză.

3. În ateroscleroză se constată o modificare a potenţialului antioxigenic al ţesuturilor, respectiv un dezechilibru al factorilor pro- şi antioxidanţi.

4. Administrarea de oxigen în şocul cardiogen trebuie făcută cu prudenţă dacă în deteriorările proprii fenomenului aterosclerotic se invocă, printre alţi factori, peroxidarea lipidică excesivă.

Prezentat la redacţie
la 24 mai 1981

Institutul de medicină şi farmacie, Bucureşti,
Catedra de biochimie

LIPID PEROXIDATION IN ATHEROSCLEROSIS

SUMMARY

Lipoperoxide concentration and the content of nonprotein thiol compounds were investigated in atherosclerotic subjects as compared to controls.

A significant increase in the blood lipoperoxide concentration, estimated by the thiobarbituric acid test, and a substantial decrease in the nonprotein thiol content were found in atherosclerotic subjects *versus* normal ones. These changes are assumed to be significant in the pathogenesis of atherosclerotic lesions.

BIBLIOGRAFIE

1. W. A. HARLAND, J. D. GILBERT, C. J. BROOKS, Biochim. biophys. Acta, **316**, 378 (1973).
2. F. P. WOODFORD, C. J. BÖTTEHER, K. OEFFE, E. H. AHRENS, J. Atheroscl. Res., **5**, 311 (1965).
3. M. IWAKAMI, Nagoya J. med. Sci., **28**, 50 (1965).
4. N. FUKUZUMI, Ann. N. Y. Acad. Sci., **171**, 24 (1970).

5. SHI-KAUNG PENG, M. D. BRUCE TAYLOR, NICHOLAS T. WERTHESSEN, BELMA MIKKELSON, Arch. Path. Lab. Med., **102**, 57 (1978).
6. R. B. WILSON, P. M. NEWBERNE, M. W. CONNER, Exp. mol. Path., **18**, 357 (1973).
7. I. FRIDOVICH, Science, **201**, 875 (1978).
8. P. J. O'BRIEN, Canad. J. Biochem., **47**,485 (1969).
9. VERONICA DINU, Physiologie, **16**, 285 (1979).
10. J. E. PACKER, T. F. SLATER, R. L. WILSON, Nature, **278**, 737 (1979).
11. L. DAHLE, E. HILLE, R. T. HOLMAN, Arch. Biochem. Biophys., **98**, 253 (1962).
12. J. B. SMITH, C. M. INGERMAN, M. J. SILVER, J. Lab. clin. Med., **88**, 167 (1976).
13. P. C. JOCELYN, *Biochemistry of SH Groups*, Academic Press, London, 1972.
14. J. SEDLAK, R. LYNSDAY, Analyt. Biochem., **25**, 192 (1968).
15. P. JOANNY, J. CORRIOL, C. R. Soc. Biol., **165**, 1341 (1971).
16. D. J. AL-TIMIMI, T. L. DORMANDY, Biochem. J., **168**, 283 (1977).
17. ANA ASLAN, GEORGETA ENĂCHESCU, Romanian J. Geront. Geriatrics, **1**, 73 (1980).
18. A. M. FOGELMAN, I. SHECHTER, JANET SEAGER, MARTHA HOKOM, J. S. CHILD, P. EDWARDS, Proc. nat. Acad. Sci., **77**, 2214 (1980).
19. P. J. FLYNN, W. K. BECKER, D. E. SCHMIDT HAMMER, Clin. Res., **28**, 169 A (1980).
20. A. L. TAPPEL, Fed. Proc., **32**, 1870 (1973).
21. VERONICA DINU, ILEANA DINU, ELENA CRISTEA, LIANA BOGHIANU, ILEANA MIHĂILESCU ,Rev. roum. Biochim., **14**, 87 (1977).
22. P. J. O'BRIEN, R. C. GREEN, Biochem. J., **103**, 329 (1967).
23. F. ANTONIADES, P. HELDIN, Proc. nat. Acad. Sci., **76**, 1809 (1979).

INFLUENŢA TEMPERATURII ASUPRA FORMELOR MOLECULARE MULTIPLE ALE FOSFATAZEI ACIDE DIN GRÎU (*Triticum aestivum*)

IOANA HAGIMA

Rezumat. S-a cercetat prin electroforeza în gel de poliacrilamidă influenţa unei game de temperaturi cuprinse între —12°C şi +70°C asupra formelor moleculare multiple ale fosfatazei acide din seminţe şi din frunze de grîu hexaploid, *Triticum aestivum*. Enzimograma fosfatazei acide din frunze se modifică la temperatura de 70°C, iar cea corespunzătoare seminţelor la temperatura de 65°C.

Comportarea fosfatazei acide în diferite condiţii de temperatură exprimă un caracter important al acestei fosfomonoesteraze, corelîndu-se în unele cazuri cu adaptarea plantelor la secetă sau la temperaturi scăzute.

În literatura de specialitate, studiul influenţei temperaturii asupra enzimelor a mai fost efectuat atît din punct de vedere cantitativ (1)—(3), cît şi calitativ (4), (5).

În prezenta lucrare ne-am propus studiul influenţei unei game de temperaturi asupra formelor moleculare multiple ale fosfatazei acide din seminţe şi frunze de grîu hexaploid, *Triticum aestivum*. Scopul acestei lucrări este de a contura prin investigaţii „in vivo" şi „in vitro" stabilitatea termică a formelor moleculare multiple ale fosfatazei acide la temperaturi cuprinse între —12°C şi + 70°C.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe seminţe şi frunze ale următoarelor soiuri de grîu hexaploid, *Triticum aestivum* (genom ABD): Sava, Doina, Lovrin-32, Blue-boy, Diana, Mironovskaia 808, M. V.-6 şi numai pe seminţe provenite de la soiurile de grîu hexaploid: Iulia, Ceres, Dacia, Libellula, Bezostaia I, Alabaskaia şi Iliciovka.

În cazul condiţiilor „in vivo" s-au analizat extracte din frunze de la plante supuse temperaturii de 60°C, în etuvă, timp de 5 sau 10 ore.

În cazul condiţiilor „in vitro" s-au examinat extracte brute de seminţe sau de frunze care au fost direct supuse temperaturilor de 50, 60, 65 şi 70°C, timp de 30 min.

O altă variantă experimentală tot „in vitro" a reprezentat-o influenţa temperaturilor scăzute de —12°C (congelator) şi de + 4°C (frigider), timp de 20 ore, asupra spectrului enzimatic al fosfatazei acide din extracte de seminţe şi frunze.

Condiţiile de extracţie pentru seminţe, de electroforeză şi de revelare a activităţii enzimatice au fost descrise anterior (6). Condiţiile de extracţie pentru frunze au fost: o parte material proaspăt cu una sau două părţi tampon. Frunzele au fost crescute în condiţii de laborator şi analizate la 10—12 zile de la germinare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Enzimograma extractului din frunzele soiului Lovrin-32 fără tratament termic, considerat deci martor, relevă 4 grupuri de fracţiuni, care însumează 9 fracţiuni cu activitate fosfatazică, mai bine conturate fiind

grupurile al doilea și al treilea, cu mobilitate electroforetică intermediară (fig. 1, *a*).Acest spectru este același pentru toate soiurile de grîu hexaploid analizate, spre deosebire de spectrele electroforetice ale semințelor unde diferențele semnalate au dus la descrierea mai multor tipuri de enzimograme (Ioana Hagima și N. N. Săulescu, date nepublicate, 1980).

Analiza extractelor din frunze provenite de la plante ținute în etuvă la 60°C timp de 5 sau 10 ore (condiții „in vivo") a relevat faptul că formele moleculare multiple ale fosfatazei acide nu sînt afectate de această temperatură, indiferent de timpul de menținere a probelor în condițiile specificate (fig. 1, *b*, *c*). Această comportare denotă o stabilitate termică evidentă a enzimei cercetată „in vivo".

Pentru urmărirea aceleiași stabilități termice a formelor moleculare ale fosfatazei acide în condiții „in vitro", extractele brute de semințe sau de frunze au fost direct supuse temperaturilor de 50, 60, 65 și 70°C, timp de 30 min. Am optat pentru timpul de 30 min tocmai pentru a avea certitudinea influenței temperaturilor respective. În literatură, stabilitatea termică a enzimei s-a studiat prin incubarea extractului enzimatic timp de numai 5 min la diferite temperaturi (1). În experiențele noastre am pornit de la examinarea temperaturilor începînd cu 50°C, deoarece Kubis și Wieczorek (7) au relevat faptul că enzima din diferite specii de graminee a fost stabilă la 50°C, arătînd totodată că fosfataza acidă este o glicoproteină.

Enzimogramele fosfatazei acide din extractele de semințe incubate la 50 și 60° C timp de 30 min nu sînt modificate (fig. 1, *d*), ceea ce denotă că toate formele moleculare multiple rămîn active la aceste temperaturi. Enzimogramele extractelor incubate la 65°C prezintă modificări la nivelul fracțiunilor codificate atît de genomul A, cît și de genomul D. Astfel, spectrul relevă o singură fracțiune, în loc de două, în grupul codificat de genomul A și de asemenea tot o singură fracțiune, în loc de 4, în grupul sintetizat de genomul D (fig. 1, *e*). Studiile lui Jaaska (8) redau corespondența dintre diferitele genomuri de la grîul hexaploid și fracțiunile fosfatazei acide în a căror biosinteză sînt implicate. Același spectru se evidențiază și cînd extractele s-au incubat la 70°C (fig. 1, *f*). Merită menționat faptul că formele moleculare ale fosfatazei acide în a căror biosinteză este implicat genomul B din semințele grîului hexaploid sînt clar exprimate chiar la 70°C, relevîndu-se astfel o termostabilitate particulară a acestui grup de fracțiuni.

Enzimogramele fosfatazei acide din extracte de frunză incubate la temperaturile de 50, 60 și 65°C nu au fost influențate de aceste temperaturi (fig. 1, *g*). Spectrul enzimatic al extractului de frunze incubat la 70°C a relevat un număr mai mic de fracțiuni, și anume numai 4 din cele 9 existente inițial (fig. 1, *h*). Această comportare evidențiază o stabilitate termică mai pronunțată a formelor moleculare ale fosfatazei acide din frunze comparativ cu cele din sămînță. Aprecierea vizuală a enzimogramelor demonstrează că fosfataza acidă din frunze este parțial activă chiar la 70°C. Această termostabilitate se poate corela întrucîtva cu adaptarea plantelor la secetă, deși nu cunoaștem încă implicarea fosfatazei acide în vreuna din verigile metabolice răspunzătoare de adaptarea la secetă. Rao și Naina-

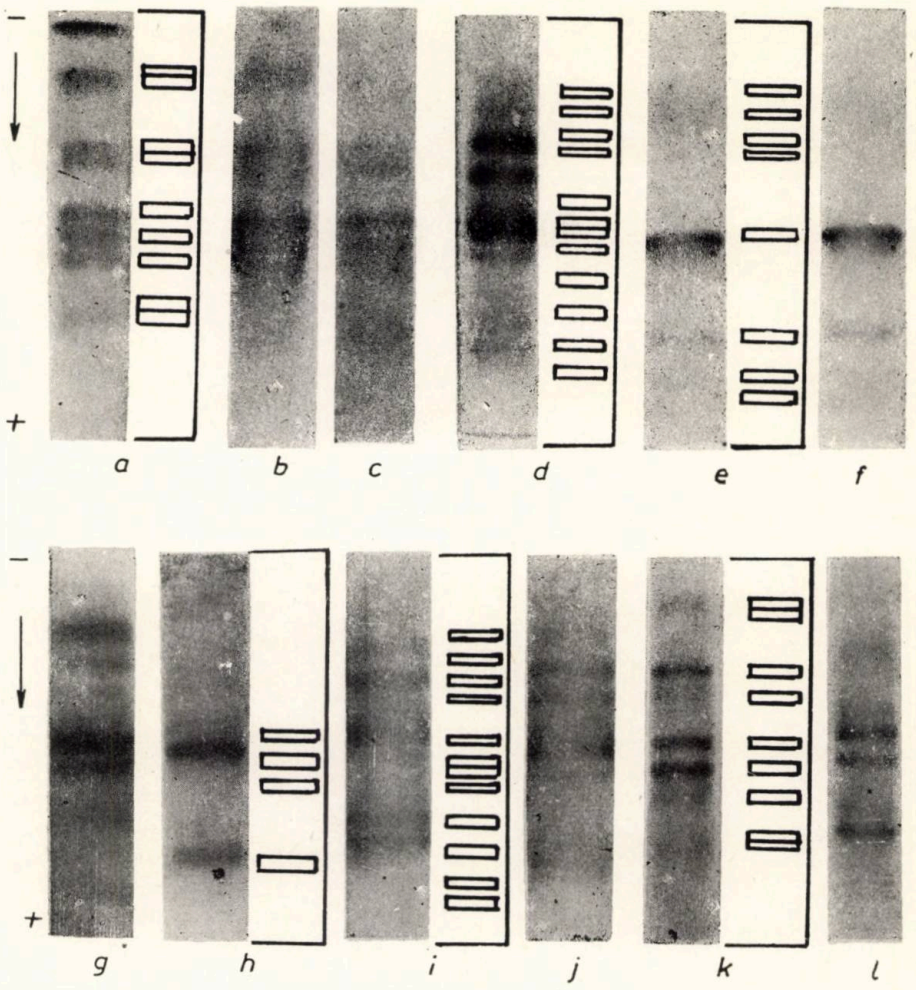


Fig. 1. — Enzimogramele fosfatazei acide din semințe și frunze menținute la diverse temperaturi : *a* — extract de frunze ale soiului Lovrin - 32, martor ; *b*, *c* — extract de frunze de la plante ținute la 60°C, timp de 5 ore (*b*) și de 10 ore (*c*) ; *d*, *e*, *f* — extract de semințe incubat timp de 30 min la 60°C (*d*), la 65°C (*e*) și la 70°C (*f*) ; *g*, *h* — extract de frunze incubat timp de 30 min la 60°C (*g*) și la 70°C (*h*) ; *i*, *j* — extract de semințe menținut timp de 20 ore la + 4°C (*i*) și la — 12°C (*j*) ; *k*, *l* — extract de frunze menținut timp de 20 ore la + 4°C (*k*) și la — 12°C (*l*).

watee (1) consideră, referitor la supraviețuirea plantelor în condiții de secetă, că aceasta s-ar datora unor răspunsuri biochimice de natură protectiv-adaptativă din partea organismului vegetal.

Într-o altă variantă experimentală tot „in vitro" am supus extracte de semințe sau de frunze la temperaturi de +4°C și de −12°C, timp de 20 ore, după care electroforeza s-a desfășurat în condiții normale, la temperatura camerei. Nici una din aceste două temperaturi nu a adus modificări asupra spectrului enzimatic din semințe (fig. 1, *i*, *j*) sau din frunze (fig. 1, *k*, *l*).

Studii privind influența temperaturilor scăzute s-au mai efectuat atît sub aspect calitativ, cît și cantitativ. Astfel, s-a constatat că în plantele de grîu crescute la temperatură joasă (5°C) se observă o intensificare a unor benzi cu activitate indolacetic acid-oxidazică și apare chiar o izoenzimă sintetizată „de novo" (5).

Roberts (4) a observat în frunzele de grîu crescute la 6°C intensificarea unei izoperoxidaze anionice, comparativ cu frunzele crescute la 20°C. În cazul formelor moleculare ale fosfatazei acide din semințe sau din frunze cercetate în prezenta lucrare, cele două temperaturi de +4°C și de −12°C studiate nu au afectat spectrul enzimatic, demonstrînd stabilitatea termică a acestei enzime.

CONCLUZII

1. Enzimograma fosfatazei acide din frunze este aceeași pentru soiurile de grîu hexaploid analizate.
2. Formele moleculare multiple ale fosfatazei acide din frunzele plantulelor ținute la 60°C nu au fost afectate.
3. Temperatura de 65°C a adus modificări asupra unor forme moleculare ale fosfatazei acide din extracte de semințe, iar unele forme moleculare multiple ale fosfatazei acide din extracte de frunze au fost influențate de temperatura de 70°C.
4. Temperaturile scăzute de +4°C sau de −12°C nu au afectat formele moleculare multiple ale fosfatazei acide din extractul de semințe sau de frunze.

Prezentat la redacție
la 5 iunie 1981

Institutul de cercetări pentru cereale și plante tehnice Fundulea, Colectivul de biochimie

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON ACID PHOSPHATASE MULTIPLE MOLECULAR FORMS IN WHEAT (*Triticum aestivum*)

SUMMARY

The influence of different temperatures ranging between −12°C and +70°C on acid phosphatase multiple molecular forms in seeds and leaves

of hexaploid wheat, *Triticum aestivum*, were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. The leaf zymogram is altered at 70°C and the seed zymogram at 65°C.

BIBLIOGRAFIE

1. A. S. RAO, H. S. NAINAWATEE, Biol. Plant., **20**, 309 (1978).
2. I. KOVÁCS, O. FEJÉR, M. DEVAY, Acta Bot. Acad. Sci. Hung., **24**, 91 (1978).
3. D. W. A. ROBERTS, Canad J. Bot., **54**, 1509 (1976).
4. D. W. A. ROBERTS, Canad. J. Bot., **47**, 263 (1969).
5. I. KOVÁCS, O. FEJÉR, M. DEVAY, Biochem. Physiol. Pflanzen, **173**, 327 (1978).
6. IOANA HAGIMA, STĂNICA NICOLAE, Rev. roum. Biochim., **18**, 21 (1981).
7. I. L. KUBIS, E. WIECZOREK, 12th FEBS Meeting-Abstracts, Dresden, nr. 0214, 1978.
8. V. JAASKA, Izv. Akad. Nauk Est. S. S. R., Biologhia, **XVIII**, 170 (1969).

CERCETĂRI PRIVIND ACŢIUNEA ANTIFUNGICĂ A UNOR NOI TRINITROFENILAMINE ŞI TRINITROFENILENDIAMINE N,N'-DISUBSTITUITE

EMANUELA IONESCU *, P. PAPACOSTEA **

Rezumat. Acţiunea antifungică a 10 compuşi nou sintetizaţi, trinitrofenilamine şi trinitrofenilendiamine N, N'-disubstituite, a fost testată asupra unor specii de ciuperci, saprofite comune în solurile româneşti. S-a constatat că aceste noi substanţe pot afecta dezvoltarea ciupercilor, unele inhibînd total sporularea lor.

Este cunoscut faptul că diferite tipuri de ciuperci produc maladii ce afectează puternic regnul animal şi vegetal, ceea ce a determinat nenumărate cercetări în direcţia găsirii de substanţe fungistatice.

În prezenta lucrare ne-am propus să studiem acţiunea antifungică a 12 compuşi, dintre care 10 nou sintetizaţi (1), (2), trinitrofenilamine şi trinitrofenilendiamine N, N'-disubstituite, asupra unor specii de ciuperci, saprofite comune în solurile româneşti, unele fiind întîlnite şi pe materii organice în curs de degradare.

Literatura menţionează substanţe cu acţiune fungistatică avînd structuri asemănătoare compuşilor nou sintetizaţi (3).

Studiul s-a efectuat atît în mediu lichid cît şi în mediu solid, deoarece acţiunea antifungică a aceleiaşi substanţe asupra aceleiaşi ciuperci poate să difere în funcţie de mediul de cultură.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a folosit o suspensie de conidii pregătită din culturi de 10—12 zile ale unor specii aparţinînd genurilor *Penicillium* şi *Aspergillus* pe mediu cu extract de valeriană solidificat cu agar-agar 1,8% (4).

S-a inoculat şi s-a incubat la temperatura camerei.

După 10—12 zile s-au recoltat cu ansa bacteriologică în mod repetat conidiofori, care s-au agitat apoi în 10 ml ser fiziologic, obţinîndu-se suspensia folosită pentru inoculare.

Ca mediu lichid de cultură s-a folosit mediul cu extract de valeriană preparat din rădăcină de valeriană, soluţie 1% (4).

Din substanţele studiate au fost preparate soluţii alcoolice 2%, care au fost diluate apoi de zece ori cu mediu de cultură, obţinîndu-se suspensii sau emulsii.

În final, testările au fost făcute folosindu-se diluţia 1/5000, considerată de unii cercetători ca o ,,diluţie prag''(3).

În eprubete conţinînd mediul cu valeriană şi substanţele de testat în concentraţia stabilită, s-au adăugat cîteva picături de suspensie de conidii, eprubetele fiind incubate la 28°C timp de cinci zile.

Ca mediu solid de cultură s-a folosit mediul Czapek-Dox agarizat (5).

După turnarea şi solidificarea mediului în cutii Petri cu diametrul de 10 cm, s-au realizat în fiecare placă trei godeuri cu diametrul de aproximativ 0,8—1 cm.

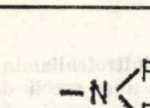
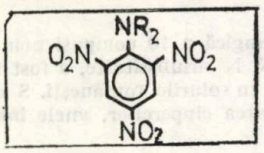
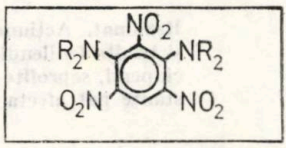
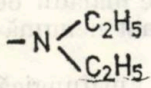
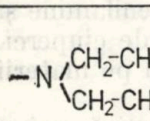
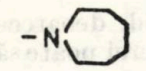
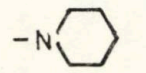
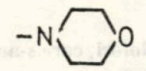
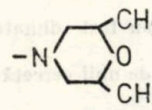
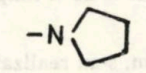
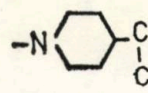
S-a inoculat suspensia de conidii în gazon, după care în fiecare godeu s-au introdus 0,5 ml din emulsiile substanţelor de testat în concentraţie de 0,2%.

Pentru experienţe au fost alese următoarele specii de ciuperci : *Penicillium simplicissimum, Penicillium funiculosum, Penicillium variabile, Aspergillus awamori, Aspergillus wenti, Aspergillus niger, Aspergillus niger mutant ocru, Aspergillus clavatus.*

Substanţele testate sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Trinitrofenilamine şi trinitrofenilendiamine N,N'-disubstituite testate

		
	N-2,4,6-trinitrofenildietilamina	bis (N-dietilamino) trinitrobenzenul
	—	bis(N-diizobutilamino) trinitrobenzenul
	N-2,4,6-trinitrofenilpirolidina	bis (N-pirolidino) trinitrobenzenul
	—	bis(N-piperidino) trinitrobenzenul
	N-2,4,6-trinitrofenilmorfolina	bis(N-morfolino) trinitrobenzenul
	—	bis (N-dimetilmorfolino) trinitrobenzenul
	N-2,4,6-trinitrofenilhexa-metilenimina	bis (N-hexametilenimino) trinitrobenzenul
	—	bis (N-benzilpiperidino) trinitrobenzenul

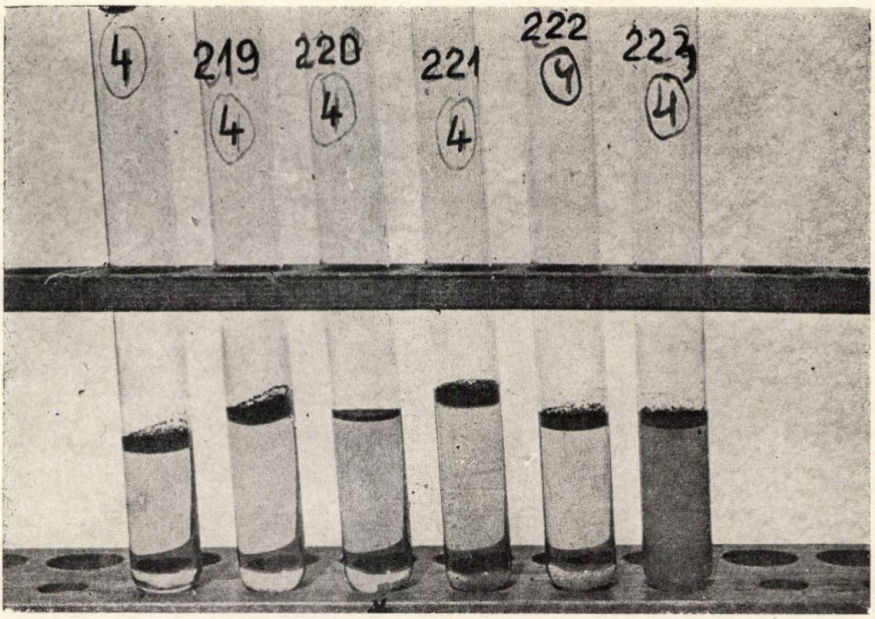


Fig. 1. — Inhibarea totală a sporulării ciupercii *Aspergillus awamori* sub acțiunea bis (N-pirolidino) trinitrobenzenului (220).

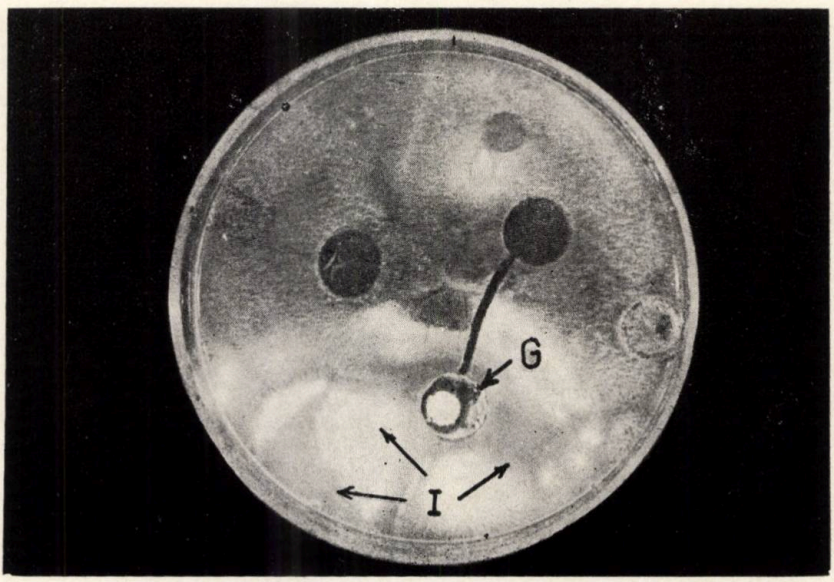


Fig. 2. — Inhibarea totală a sporulării ciupercii *Aspergillus niger* sub acțiunea bis (N-morfolino) trinitrobenzenului ; G — godeu ; I — zonă de inhibare totală.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pe mediu lichid, în condițiile de experiență date, se constată următoarele :

Bis(N-pirolidino) trinitrobenzenul inhibă total sporularea ciupercilor studiate (fig. 1).

N-2,4,6-Trinitrofenildietilamina inhibă sporularea la *Penicillium simplicissimum* și *Penicillium funiculosum*.

Aproape toți compușii studiați stimulează pigmentarea micelară a tulpinii de *Penicillium funiculosum*. Se observă o colorație roșu vinăt, care în timp trece în verde, sau colorarea directă a ciupercii în verde.

Bis(N-morfolino) trinitrobenzenul stimulează pigmentarea miceliană la *Penicillium simplicissimum* și inhibă sporularea la *Aspergillus clavatus*.

În unele cazuri *(Aspergillus wenti)*, trinitrofenilaminele testate stimulează dezvoltarea ciupercii.

Experiențele conduse pe mediu solid pun în evidență inhibarea totală a sporulării la *Aspergillus niger* sub acțiunea bis (N-morfolino) trinitrobenzenului (fig. 2). Același compus inhibă parțial sporularea ciupercilor *Aspergillus niger mutant ocru* și *Aspergillus clavatus*.

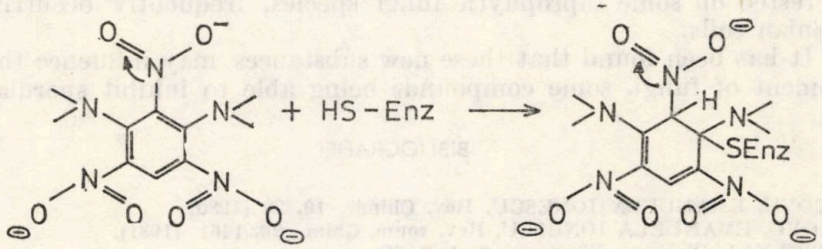
Bis(N-pirolidino) trinitrobenzenul inhibă total sporularea tulpinilor de *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus wenti*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus mutant ocru* și *Aspergillus clavatus*.

Toate substanțele studiate stimulează dezvoltarea tulpinilor de *Penicillium simplicissimum* pe mediu solid.

Acțiunea diferită a compușilor sintetizați se datorește probabil atît diferențelor de structură chimică, cît și particularităților de construcție celulară, structură chimică și permeabilitate celulară a ciupercii care determină sensibilități diferite față de unul și același compus.

În literatură se menționează faptul că, la compușii care au grupe nitro grefate pe un atom de carbon implicat în dubla legătură, poate să apară o acțiune fungistatică. Datorită caracterului electrofil al grupei nitro, are loc o polarizare a dublei legături spre această grupare. Devine astfel posibilă reacția cu anumite grupări active din enzime, cum ar fi —SH-ul (6).

În cazul compușilor sintetizați poate fi imaginat un mecanism similar de reacție :



Afinitatea față de grupele sulfhidril ale enzimelor, dependentă puternic de natura radicalului (rest de amină), va determina o anumită intensitate a acțiunii antifungice.

Funcţia normală biochimică a ciupercii ar putea fi de asemenea denaturată prin formarea unor asociaţii între compuşii cu grupe nitro şi proteinele din celulele ciupercilor.

Cu alte cuvinte, denaturarea proteinelor celulare ale ciupercilor s-ar putea datora fie inactivării oxidative a enzimelor sulfhidrilice, fie formării de asociaţii moleculare cu componente celulare individuale, una sau alta din reacţii predominînd în funcţie de structura chimică a compusului.

Avînd în vedere înrudirea structurală cu alţi compuşi ce prezintă acţiune fungistatică, precum şi rezultatele testărilor efectuate, se poate afirma că există posibilitatea potenţială ca substanţele studiate să manifeste acţiune antifungică şi asupra altor ciuperci sau bacterii.

CONCLUZII

În urma experienţelor privitoare la acţiunea unor noi compuşi din clasa trinitrofenilaminelor şi a trinitrofenilendiaminelor N,N'-disubstituite asupra unor ciuperci, saprofite comune în solurile româneşti, se poate trage concluzia că aceste substanţe afectează dezvoltarea ciupercilor, unele inhibînd total sporularea lor.

Prezentat la redacţie
la 15 ianuarie 1981

* *Institutul agronomic „N. Bălcescu", Bucureşti,*
Facultatea de zootehnie,
Catedra de chimie
şi
***Institutul de cercetări pentru pedologie şi agrochimie*

ANTIFUNGIC ACTION OF SOME NEW TRINITROPHENYL AMINES AND N,N'-DISUBSTITUTED TRINITROPHENYLENE DIAMINES

SUMMARY

The antifungic activity of 10 new synthesized compounds, trinitrophenylamines and N,N'-disubstituted trinitrophenylene diamines, has been tested on some saprophytic fungi species, frequently occurring in Romanian soils.

It has been found that these new substances may influence the development of fungi, some compounds being able to inhibit sporulation.

BIBLIOGRAFIE

1. M. IOVU, EMANUELA IONESCU, Rev. Chimie, **10**, 28 (1980).
2. M. IOVU, EMANUELA IONESCU, Rev. roum. Chim., **26**, 1461 (1981).
3. T. ZSOLNAI, Biochem. Pharmac., **5**, 1 (1960).
4. P. PAPACOSTEA, NEONILA PETRE, An. Inst. cerc. pedologie — agrochimie, **XLII**, 109 (1974).
5. K. B. RAPER, D. T. FENELL, *The genus Aspergillus*, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965.
6. T. ZSOLNAI, Biochem. Pharmac., **6**, 287 (1961).

METODĂ AMILOCLASTICĂ PENTRU DETERMINAREA SELECTIVĂ A α-AMILAZEI UTILIZÎND SUBSTRAT INSOLUBIL
(notă preliminară)

M. A. MATEESCU

Rezumat. Metoda descrisă este bazată pe acţiunea selectivă a α-amilazei din preparatele amilolitice asupra amilozei reticulate (substrat insolubil). Sub acţiunea hidrolitică a α-amilazei se eliberează din substratul insolubil fragmente polizaharidice, care trec în soluţie. Cantităţile de fragmente polizaharidice astfel solubilizate sînt în dependenţă lineară de activităţile α-amilazice şi pot fi determinate în mediul de reacţie prin măsurarea absorbanţelor compuşilor de incluziune formaţi în urma reacţiei cu reactivul I_2/KI. Limitele de detecţie ale metodei sînt comparabile cu cele ale metodei cromogenice, bazată pe utilizarea de substrate insolubile de tip Phadebas.

În literatura de specialitate sînt descrise numeroase metode de determinare a enzimelor amilolitice (1) — (14), care pot fi clasificate în :

— metode reductometrice, bazate pe determinarea cu diferiţi reactivi a grupărilor reducătoare ale zaharidelor eliberate în mediu prin hidroliza enzimatică a unor substrate, ca amidon, amiloză, amilopectină, glicogen şi altele (1) — (5);

— metode cromogenice, bazate pe utilizarea de substrate insolubile care posedă grupări cromofore grefate şi care sînt eliberate în mediul de reacţie odată cu hidroliza substratului, ducînd astfel la creşterea absorbanţelor datorită grupărilor cromofore cu care sînt substituite maltoza sau dextrinele solubilizate în mediu (6) — (9);

— metode amiloclastice (iodometrice) (10) — (12), bazate pe determinarea cantităţii de amidon solubil rămas nehidrolizat în urma acţiunii hidrolitice a enzimelor amilolitice, prin măsurarea absorbanţelor compuşilor de incluziune formaţi în urma reacţiei cu reactivul I_2/KI ;

— metode enzimatice (cinetice), recent elaborate şi introduse în laboratoarele clinice (13), (14); metodele multienzimatice constituie însă obiectul unor discuţii (9), (14), unele dintre ele referindu-se şi la posibilele interferenţe ce pot apărea la determinările indirecte de acest tip.

Metoda amiloclastică propusă de noi prevede utilizarea amilozei reticulate ca substrat insolubil pentru determinarea selectivă a α-amilazei. Ca principiu, metoda elaborată se bazează pe determinarea fragmentelor polizaharidice eliberate în mediu (solubilizate) din substratul insolubil, sub acţiunea catalitică a α-amilazei. Cu cît acţiunea catalitică a α-amilazei este mai pronunţată, cu atît sînt eliberate din substrat fragmente polizaharidice în proporţie mai mare şi cu atît mai intensă va fi deci reacţia acestora cu reactivul I_2/KI. Procedeul constă deci în determinarea iodometrică a lanţurilor polizaharidice eliberate sub acţiunea preparatului amilolitic asupra amilozei reticulate.

St. cerc. biochim., 24, 2, 175—179 (1981)

Testările au fost efectuate utilizîndu-se un preparat de α-amilază bacteriană cristalizată (SIGMA), precum și preparate de β-amilază (SIGMA) și glucoamilază (MERCK). S-au mai utilizat amiloză (KOCH LIGHT) și reactiv I_2/KI, livrat de REACTIVUL-București.

Reticularea amilozei a fost efectuată în condiții anterior descrise (15), (16) prin tratarea în mediu alcalin a 100 g amiloză cu 7 g epiclorhidrină, obținîndu-se astfel amiloza reticulată X—7, care a fost trecută în stare uscată prin deshidratare blîndă cu acetonă (17), (18).

Practic, determinarea constă în suspendarea (pentru gomflare) a 0,06 g amiloză reticulată (amiloză X—7) în 2 ml soluție tampon adecvat activităților amilolitice și în tratarea ulterioară cu 1 ml preparat amilolitic. După 10 min se stopează reacția prin adaos de 7 ml soluție I_2/KI 1×10^{-3} N și se colorimetrează probele la 570 nm. Citirile se fac față de o probă martor, prelucrată identic, dar în care se introduce tampon sau apă distilată în locul preparatului amilolitic.

Metoda a fost comparată cu metoda cromogenică (6) — (9), de mare finețe și larg utilizată atît în laboratoarele de cercetare, cît și în cele de analize medicale, precum și cu metoda iodometrică (Wohlgemuth, 1908, citat de (12)). Metoda cromogenică este bazată pe utilizarea ca substrat insolubil a amidonului reticulat și funcționalizat prin grefare de grupări cromofore, conferite de colorantul Cibachron Blue FG-3A. Acest substrat insolubil (Blue Starch) este livrat de firma Pharmacia Fine Chemicals Uppsala sub formă de tablete conținînd și săruri fosforice, precum și albumină serică bovină, care la dizolvare generează mediul optim pentru activitatea α-amilazică. Substratul menționat, cunoscut sub numele de Phadebas, prezintă avantajul că amidonul utilizat, fiind reticulat, permite determinarea selectivă a α-amilazei (endoamilază), în timp ce exoamilazele (β-amilaza, glucoamilaza) nu pot acționa hidrolitic asupra respectivului substrat (19) — (22).

Metoda propusă de noi se aseamănă din anumite puncte de vedere cu metoda cromogenică amintită, și anume prin faptul că se eliberează în soluție produși de reacție din substratul insolubil (determinați ulterior iodometric) și mai ales prin faptul că, utilizînd amiloză reticulată ca substrat, aceasta permite doar acțiunea α-amilazei și deci determinarea selectivă a acesteia. De altfel, în lucrări anterioare s-a demonstrat că amiloza reticulată nu constituie substrat pentru exoamilaze (20) — (22).

Limitele de detecție ale metodei propuse sînt comparabile cu cele ale metodei cromogenice, permițînd punerea în evidență chiar a unor cantități de ordinul zecilor de ng, care nu pot fi decelate prin metode reductometrice sau iodometrice.

Metoda propusă diferă de metodele iodometrice, și ele larg utilizate. Astfel, în timp ce prin metoda amiloclastică elaborată determinările se bazează pe eliberarea în mediu a unor fragmente polizaharidice în cantități cu atît mai mari cu cît activitățile α-amilazice sînt mai intense, determinările iodometrice se bazează pe măsurarea diminuției concentrației de substrat solubil (amidon) din probe sub acțiunea amilazelor. Se poate afirma deci că apare un efect invers față de cel întîlnit la determinările iodometrice uzuale, și anume că, în urma reacției cu I_2/KI, absorbanțele mediului în care s-au eliberat produșii de reacție cresc în dependență liniară cu activitățile amilazice, așa cum se constată în figura 1.

Fragmentele polizaharidice eliberate sînt constituite dintr-un număr suficient de mare de unităţi de glucoză legate α-1,4-glicozidic şi se află într-o conformaţie adecvată, permiţînd astfel formarea compuşilor de incluziune cu iodul. Eliberarea acestor lanţuri polizaharidice suficient

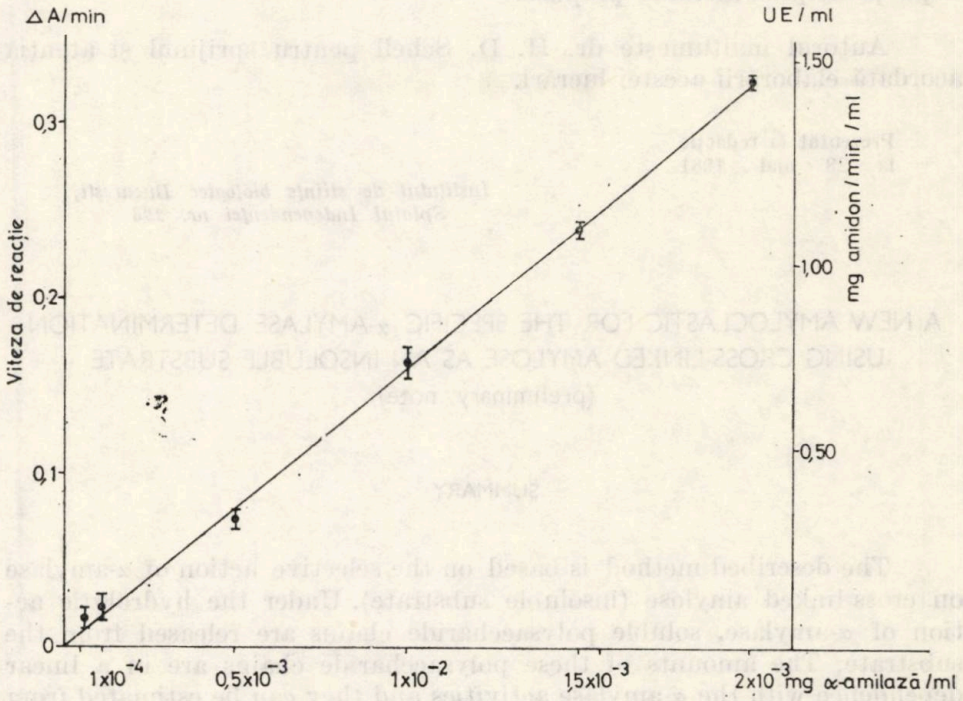


Fig. 1. — Influenţa concentraţiilor de α-amilază asupra vitezei de reacţie, determinată prin metoda amiloclastică propusă şi prin metoda iodometrică.

de lungi este posibilă datorită gradului redus de reticulare a amilozei. Pe de altă parte, amiloza reticulată ca atare nu permite formarea compuşilor de incluziune datorită structurii tridimensionale a acesteia, punţile glicerice transversale impunînd conformaţii care nu sînt adecvate formării acestor compuşi clatraţi.

Activităţile α-amilazice determinate prin prezenta metodă se exprimă, ca şi în cazul altor metode, în unităţi enzimatice, unde

1 unitate enzimatică = 1mg amidon hidrolizat/min

Corespondenţele dintre absorbanţă şi unităţile enzimatice au fost calculate prin acelaşi procedeu ca şi în cazul metodei cromogenice, ajungîndu-se în cazul nostru la relaţia :

activitate enzimatică = $4{,}46 \times \Delta A$/min/ml [mg amidon hidrolizat/min/ml] şi

activitate specifică = $4{,}46 \times \Delta A$/min/mg proteină [mg amidon hidrolizat/min/mg proteină]

unde A = absorbanţa măsurată la 570 nm .

Metoda propusă se pretează la analize de serie, inclusiv la analize clinice de serie, precum și la determinări de serie prin difuzie radială (screening), în variante ce vor fi prezentate în note viitoare. Se vor avea totodată în vedere adaptarea și standardizarea metodei pentru analizele de laborator clinic. Tot într-o notă viitoare va fi prezentată adaptarea unor metode de determinare a altor polizaharidaze (de exemplu celulazele) după principiul metodei propuse.

Autorul mulțumește dr. H. D. Schell pentru sprijinul și atenția acordată elaborării acestei lucrări.

Prezentat la redacție
la 28 mai 1981

Institutul de științe biologice București,
Splaiul Independenței nr. 296

A NEW AMYLOCLASTIC FOR THE SPECIFIC α-AMYLASE DETERMINATION USING CROSS-LINKED AMYLOSE AS AN INSOLUBLE SUBSTRATE
(preliminary note)

SUMMARY

The described method is based on the selective action of α-amylase on cross-linked amylose (insoluble substrate). Under the hydrolytic action of α-amylase, soluble polysaccharide chains are released from the substrate. The amounts of these polysaccharide chains are in a linear dependence with the α-amylase activities and they can be estimated from the absorbancies of their iodine compounds. The limits of detection of these method are in the same range with those of the chromogenic Blue Starch method, using insoluble substrate (Phadebas).

BIBLIOGRAFIE

1. G. NOELTING, P. BERNFELD, Helv. chim. Acta, **31**, 286 (1948).
2. A. DAHLQUIST, Scand. J. clin. Lab. Invest., **14**, 145 (1962).
3. J. F. ROBYT, W. J. WHELAN, Anal. Biochem., **45**, 510 (1972).
4. J. F. ROBYT, W. J. WHELAN, *The α-amylases*, în *Starch and its derivatives*, ed. a 4-a, sub red. J. A. RADLEY, Chapman and Hall, London, 1968, p. 431—433.
5. I. F. DUMITRU, *Lucrări practice de biochimie*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1967.
6. M. CESKA, E. HULTMAN, B. G. A. INGELMAN, Experientia, **25**, 555 (1969).
7. M. CESKA, K. BIRATH, B. BROWN, Clin. chim. Acta, **26**, 437 (1969).
8. M. D. O'DONNELL, K. F. McGEENEY, Enzyme, **18**, 348 (1974).

9. K. F. McGEENEY, *Isoamylase-S-type amylase and P-type amylase*, în Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala-Sweden, 1980.
10. H. V. STREET, J. R. CLOSE, Clin. chim. Acta, **1**, 256 (1956).
11. P. METAIS, J. BIETH, Ann. Biol. clin., **26**.133 (1968).
12. G. NUȚĂ, G. BUȘNEAG, *Investigații biochimice*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1977, p. 274.
13. * * * *α-Amylase mit definiertem Substrat*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, 1980.
14. J. J. MARSHALL, Clin. Chem., **25**, 1675 (1979).
15. M. ȘERBAN, H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Rev. roum. Biochim., **12**, 187 (1975).
16. M. ȘERBAN, M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, Brevet R. S. România 61524/1976.
17. H. D. SCHELL, V. GHEȚIE, Brevet R. S. România 56403/1971.
18. V. GHEȚIE, H. D. SCHELL, Experientia, **27**, 1384 (1971).
19. J. J. MARSHALL, Anal. Biochem., **37**, 466 (1970).
20. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, F. MIHĂILESCU, I. CORNOIU, Biochimie, **58**, 875 (1976).
21. M. A. MATEESCU, Biochimie, **60**, 535 (1978).
22. M. A. MATEESCU, I. CORNOIU, H. D. SCHELL, Anal. Lett., **13**, 1567 (1980).

SEPARAREA PRIN CROMATOGRAFIE DE AFINITATE A UNUI INHIBITOR NATURAL AL α-CHIMOTRIPSINEI DIN TUBERCULI DE CARTOF ŞI UNELE PROPRIETĂŢI ALE ACESTUIA

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, A. WAHEED

Rezumat. Se descrie separarea unui inhibitor natural al α-chimotripsinei dintr-un extract brut de tuberculi de cartof prin cromatografie de afinitate pe α-chimotripsină imobilizată prin legarea covalentă de un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN. Preparatul imobilizat are un conţinut în enzimă de 0,8 mg α-chimotripsină/ml gel, o activitate proteolitică reziduală de 55% (substrat cazeină) şi o activitate esterazică reziduală de 83,6% (substrat ATEE), respectiv de 84,6% (substrat BTEE). Inhibitorul izolat se prezintă la electroforeză în gel de poliacrilamidă ca o fracţiune omogenă cu o viteză relativ mică de migrare şi exercită o acţiune de inhibiţie competitivă atît asupra activităţii proteolitice, cît şi asupra celei esterazice a α-chimotripsinei. Valorile K_i ale inhibitorului în cazul celor două activităţi catalitice sînt identice sau apropiate la enzima liberă, dar diferă mult pentru enzima imobilizată, fiind mult mai crescute (de 11—12 ori) în cazul activităţii esterazice, în comparaţie cu valoarea găsită în cazul activităţii proteolitice, unde K_i creşte doar de trei ori în urma imobilizării enzimei. Suportul afin poate fi folosit de repetate ori şi timp îndelungat cu aceeaşi eficienţă.

Prin selectivitatea, eficienţa şi simplitatea ei, cromatografia de afinitate depăşeşte cu mult metodele clasice folosite pînă în prezent în laboratoarele de biochimie analitică şi preparativă pentru izolarea şi purificarea de produşi biologic activi (1) şi a devenit o metodă foarte apreciată şi tot mai larg răspîndită, mai ales după apariţia lucrării clasice a lui Cuatrecasas, Wilchek şi Anfinsen (2). Această metodă se bazează, după cum se ştie, pe reacţia ce are loc între doi reactanţi, efectorul şi partenerul său afin, care se pot lega unul de celălalt în mod selectiv şi reversibil. Prin această metodă s-au separat în laboratorul nostru, în stare pură şi într-o singură treaptă de lucru, o serie de enzime şi inhibitori naturali ai acestora, dintre care amintim, de pildă, streptokinaza pe un suport afin de antistreptokinază imobilizată şi plasminogenul pe lizină imobilizată (3), aspartat aminotransferaza pe un suport afin realizat prin imobilizarea substratelor ei, acidul aspartic şi acidul α-cetoglutaric (4), α-amilaza pe amiloză reticulată cu epiclorhidrină (5), ovoinhibitorul din albuş de ou pe tripsină imobilizată[1] şi altele.

În continuare, în lucrarea de faţă se prezintă separarea unui inhibitor natural al α-chimotripsinei (α-Cht) dintr-un extract brut de cartof (*Solanum tuberosum*) prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe un gel perlat de agaroză reticulată cu epiclorhidrină şi activată cu BrCN. Se descriu totodată şi unele proprietăţi caracteristice ale inhibitorului izolat.

Menţionăm cu această ocazie şi lucrările publicate de Malova şi Şulmina (6), de Iwasaki şi colab. (7), (8) şi de Melville şi Ryan (9), care

[1] H. D. Schell, T. Benţia, C. Dăncuşi, date nepublicate, 1980.

au izolat inhibitori ai α-Cht din cartof prin metode clasice, mai laborioase (fracţionări cu sulfat de amoniu, cromatografie pe schimbători de ioni acizi şi bazici etc.). Inhibitori din cartof ai α-Cht au fost separaţi prin cromatografie de afinitate şi de Turková şi colab. (10) pe un suport afin realizat prin imobilizarea α-Cht pe un gel de hidroxialchilmetacrilat, precum şi de Ievleva şi Mosolov (11) pe α-Cht legată de Sepharose 6 B.

MATERIAL ŞI METODE

S-a folosit un preparat de α-Cht liofilizată din pancreas bovin (Biofarm, Bucureşti), care a fost imobilizată prin legarea ei covalentă de un gel perlat de agaroză reticulată, obţinută în laboratorul nostru (12) şi activată cu BrCN (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, R. F. Germania) după indicaţiile date de Axén şi Ernback (13). Drept substrat pentru determinarea activităţii proteolitice s-a folosit cazeină Hammarsten (Fluka AG, Buchs, Elveţia). Pentru determinarea activităţii esterazice s-au utilizat două substrate sintetice, N-acetil-L-tirozin-etil-ester (ATEE şi N-benzoil-L-tirozin-etil-ester (BTEE), provenite de la Firma Sigma, Chemical Company (S.U.A.).

Cuplarea α-Cht de agaroza reticulată şi activată cu BrCN a avut loc în condiţiile arătate de noi într-o lucrare anterioară (14), folosind 10 ml gel perlat de agaroză activată şi 15 mg α-Cht liofilizată.

Extractul din tuberculi de cartof a fost obţinut tratînd 50 g pulpă de cartof mărunţită fin cu 25 ml soluţie de tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6 şi centrifugînd omogenatul, după o oră de repaus la temperatura camerei, la 4500 rotaţii/minut timp de 30 min. Extractul obţinut prezenta o concentraţie proteică de 9,6 mg/ml.

Pentru separarea prin cromatografie de afinitate a inhibitorului natural al α-Cht din extractul de cartof, s-au trecut 10 ml din acest extract printr-o coloană cromatografică încărcată cu α-Cht imobilizată (cantitatea de gel 10 ml, dimensiunea coloanei 0,8 × 18 cm), colectînd la o viteză de scurgere de 40 ml/oră fracţiuni de cîte 5 ml la un colector de fracţiuni cu înregistrare automată a extincţiei la 280 nm (LKB, Suedia). După trecerea completă a proteinelor însoţitoare nereţinute de suportul afin din coloană (scăderea extincţiei practic la valoarea zero), s-au mai cules cîteva probe, care conţineau doar soluţia tamponului de lucru pentru o mai bună spălare a coloanei de gel. Pentru eluţia inhibitorului reţinut de partenerul său afin prin adsorbţie biospecifică, sau biospecifică, s-a înlocuit soluţia de tampon Tris- HCl 0,2 M, pH 7,6 cu un eluant format dintr-o soluţie de KCl 0,5 M în HCl 0,1 N (pH 2). A avut loc îndată eluţia inhibitorului, localizat în două sau, cel mult, în trei probe culese. În urma aplicării eluantului, eluţia inhibitorului se reflectă într-o nouă creştere a absorbţiei la 280 nm.

Verificarea omogenităţii electroforetice a inhibitorului izolat s-a efectuat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, după metoda clasică a lui Davis (15), folosind un gel cu o concentraţie de 10%, o tensiune de curent de 180 V, o intensitate de 4—5 mA/tub, un timp de migrare de 75 min şi ca revelator Amidoschwarz.

Urmărirea acţiunii inhibitorului izolat asupra activităţii proteolitice a α-Cht libere şi imobilizate s-a realizat prin determinarea activităţii proteolitice a celor două preparate de α-Cht după metoda lui Kunitz (16) pentru tripsină, dar modificată de Rick (17) pentru α-Cht, în absenţa şi în prezenţa unor cantităţi ale inhibitorului cuprinse între 10 şi 100 mg/probă. Cantitatea enzimei libere folosită în probă a fost de 6 μg, iar cea a enzimei imobilizate de 40 μg (0,05 ml gel enzimatic).

Pentru determinarea K_i a inhibitorului studiat în cazul activităţii proteolitice după metoda grafică a lui Dixon, s-a stabilit activitatea proteolitică şi la o a doua concentraţie de substrat (soluţie de cazeină 0,5%, în loc de 1%), menţinînd restul condiţiilor de lucru neschimbate.

Capacitatea de inhibare a inhibitorului izolat din tuberculi de cartof a fost urmărită şi în cazul activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate, folosind ca substrat atît ATEE, cît şi BTEE şi aceleaşi cantităţi de enzimă ca şi pentru determinarea activităţii proteolitice a α-Cht libere şi imobilizate. În acest scop s-a procedat în cazul ATEE după indicaţiile date de Schwert şi Takenaka (18), iar în cazul substratului BTEE după indicaţiile lui Hummel (19), folosind în mediile de reacţie respective cantităţi de inhibitor cuprinse între 0 şi 100 μg/probă. S-a lucrat şi în acest caz la două concentraţii diferite de substrat (soluţie ATEE 0,0031 M şi 0,0062 M, respectiv soluţie BTEE 0,00033 M şi 0,00066 M) în vederea determinării valorilor K_i ale inhibitorului atît în funcţie de substratul folosit, cît şi în funcţie de starea enzimei (liberă sau imobilizată). Modul amănunţit de lucru respectat de noi la aceste determinări a fost expus într-o lucrare recent publicată (14).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin legarea covalentă a α-Cht de gel perlat de agaroză reticulată și activată cu BrCN se obține un preparat enzimatic activ, care conține 0,8 mg α-Cht/ml gel. Activitatea proteolitică reziduală a preparatului obținut este de 55% (substrat cazeină). Activitatea esterazică reziduală este considerabil mai ridicată, dar practic identică pentru cele două substrate folosite, și se situează la 83,6% în cazul ATEE și la 84,6% în cazul BTEE.

Gelul enzimatic realizat prin cuplarea α-Cht de agaroză reticulată formează, datorită proprietăților sale mecanice și catalitice excelente, un suport afin ideal pentru separarea rapidă și într-un grad înalt de puritate a inhibitorilor naturali ai α-Cht din cele mai diferite surse animale sau vegetale prin cromatografie de afinitate. În cele ce urmează vom expune pe scurt rezultatele obținute la aplicarea acestui suport afin în separarea unui inhibitor natural al α-Cht din tuberculi de cartof, precum și cîteva proprietăți ale acestuia.

Figura 1 prezintă o diagramă de eluție specifică pentru separarea unui produs biologic activ prin cromatografie de afinitate. Astfel, aplicînd extractul brut din tuberculi de cartof pe coloana cromatografică încărcată cu α-Cht imobilizată, trec mai întîi toate componentele extractului nereținute de suportul afin, care recunoaște și reține prin adsorbție biospecifică doar partenerul său afin, reprezentat în cazul de față de inhibitorul natural al α-Cht. După îndepărtarea completă a proteinelor însoțitoare din extract, se înlocuiește tamponul de lucru Tris-HCl cu eluantul. Urmează eluția rapidă a inhibitorului adsorbit pe suportul afin. Determinînd acțiunea de inhibiție exercitată de probele 17—19 asupra activității proteolitice a α-Cht (substrat cazeină), se constată o corespondență între concentrația proteică și capacitatea de inhibiție, exprimată în μg α-Cht inhibată de 0,1 ml probă.

Datele experimentale obținute demonstrează totodată că, din cele 96 mg proteine conținute în extractul aplicat pe coloana cromatografică, a fost reținută de cei 10 ml gel enzimatic din coloană o cantitate de 3,5 mg proteină (inhibitor), adică 0,35 mg proteină/ml gel. Această valoare este practic identică cu cea obținută de Ievleva și Mosolov (11) dacă se ține seama de conținutul în α-Cht al conjugatului realizat de noi și de conținutul în α-Cht al preparatului realizat de autorii citați (5 mg inhibitor/ml gel enzimatic conținînd 13,5 mg α-Cht). Din aceste date rezultă și faptul că, pentru realizarea unei eficiențe mai crescute în cazul cromatografiei de afinitate, este mai avantajos un preparat cu un conținut mai ridicat în enzimă, chiar dacă activitatea sa enzimatică reziduală este mai scăzută. Astfel, preparatul imobilizat al α-Cht realizat de Ievleva și Mosolov prezintă o activitate proteolitică reziduală de numai 9%, respectiv o activitate esterazică reziduală de 20%, în comparație cu valorile de 55 și, respectiv, 84% găsite la preparatul elaborat de noi.

Analizînd prin disc-electroforeză extractul brut din tuberculi de cartof în comparație cu fracțiunea proteică eluată la pH 2, care conține inhibitorul α-Cht (fig. 2), se constată că inhibitorul izolat din numeroasele fracțiuni proteice din extractul brut (fig. 2, *a*) se prezintă omogen din punct de vedere electroforetic și este format dintr-o singură bandă proteică (fig.

2, *b*). Interesant de amintit cu această ocazie poate fi şi faptul că viteza de migrare electroforetică, adică localizarea sa în electroforegramă, este asemănătoare cu cea observată de Spiro-Kern şi Chen (20) în cazul unui inhibitor al α-Cht izolat din *Culex pipiens* tot prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe Sepharose şi este similară cu localizarea observată de noi la inhibitorul α-Cht izolat din făină de soia prin aceeaşi metodă (21).

În figura 3 se prezintă variaţia activităţii proteolitice (substrat cazeină) în funcţie de concentraţii crescînde de inhibitor atît în cazul enzimei libere, cît şi în cel al enzimei imobilizate. Odată cu creşterea concentraţiei inhibitorului în amestecul de reacţie, se observă la ambele preparate de enzimă o scădere considerabilă a activităţilor proteolitice, scădere care în cazul enzimei imobilizate este perfect liniară şi totodată mai puţin pronunţată în comparaţie cu enzima liberă. Înseamnă că, prin imobilizare, α-Cht devine mai rezistentă şi faţă de acţiunea inhibitorilor ei naturali, nu numai faţă de cea a diferitelor metale grele (22) sau faţă de influenţa negativă a temperaturii mai crescute sau a variaţiei valorilor de pH (14). Activitatea proteolitică a enzimei libere scade, de pildă, în prezenţa a 45 μg inhibitor în probă la 43% din activitatea ei iniţială în absenţa inhibitorului, în timp ce enzima imobilizată îşi păstrează în aceste condiţii încă aproape 65% din activitate. La o cantitate de 90 μg inhibitor în probă, activitatea proteolitică a enzimei libere scade chiar la 18%, condiţie în care enzima imobilizată îşi mai păstrează încă 32% din activitatea ei maximă în absenţa inhibitorului.

Această stabilitate crescută a α-Cht faţă de acţiunea inhibitorului izolat din tuberculi de cartof în urma imobilizării ei rezultă şi din constantele de inhibiţie ale acestui inhibitor, determinate după metoda grafică a lui Dixon atît pentru enzima liberă (fig. 4), cît şi pentru cea imobilizată (fig. 5).

Valoarea constantei de inhibiţie (K_i) exprimă, după cum se ştie, inversul afinităţii unei enzime faţă de inhibitorul respectiv. Cu cît valoarea K_i este mai mare, cu atît acţiunea inhibitorului asupra enzimei respective va fi mai mică sau, cu alte cuvinte, enzima va fi mai rezistentă la acţiunea inhibitorului, ceea ce de fapt se şi observă în cazul nostru. Valoarea K_i este 12 în cazul enzimei libere şi 35 în cazul enzimei imobilizate. Din datele obţinute şi redate grafic în figurile 4 şi 5 rezultă şi faptul că inhibiţia exercitată de inhibitorul izolat din cartof este competitivă, întîlnită de regulă la inhibitorii naturali ai proteazelor (23).

În continuare am studiat acţiunea inhibitorului izolat şi asupra activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate, folosind ca substrat atît ATEE, cît şi BTEE.

În figura 6 se prezintă variaţia activităţii esterazice (substrat ATEE) în funcţie de diferite concentraţii ale inhibitorului în mediul de reacţie, atît în cazul enzimei libere, cît şi în cel al enzimei imobilizate. Şi de data aceasta se observă, ca şi în cazul activităţii proteolitice, o sensibilitate mult mai redusă a α-Cht faţă de acest inhibitor în urma imobilizării ei. Astfel, în timp ce enzima liberă îşi pierde în prezenţa a 45 μg inhibitor în mediul de reacţie 75% din activitatea ei iniţială, cea imobilizată pierde în această condiţie doar 28% din activitatea ei în absenţa inhibitorului. La o cantitate de 90 μg inhibitor în mediul de incubare, enzima liberă mai păstrează doar un rest de 13% din activitatea ei iniţială, în timp ce enzima imobilizată mai prezintă în aceste condiţii încă 45% din activitatea ei iniţială.

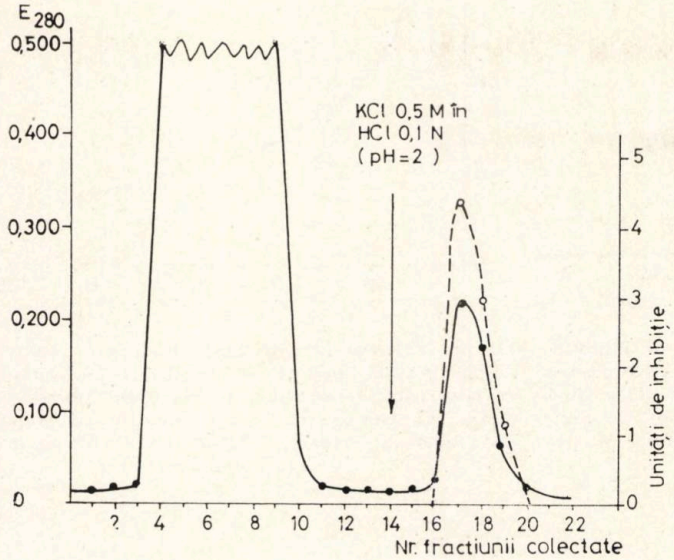


Fig. 1. — Diagrama de separare a inhibitorului natural al α-Cht din tuberculii de cartof prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată pe gel perlat de agaroză reticulată. Dimensiunea coloanei cromatografice : 0,8 × 2 cm. Volumul fracțiunilor culese : 5 ml.
●——● = concentrația proteică (extincția la 280 nm)
○ ····· ○ = inhibiția activității proteolitice (substrat cazeină), exprimată în unități de inhibiție.

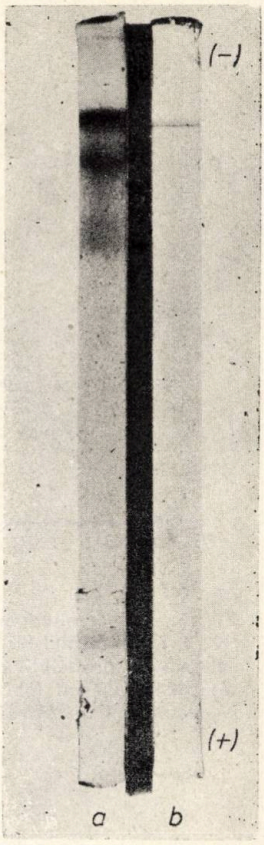


Fig. 2. — Disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă a extractului brut din tuberculii de cartof (*a*) și a inhibitorului purificat prin cromatografie de afinitate pe α-Cht imobilizată (*b*).

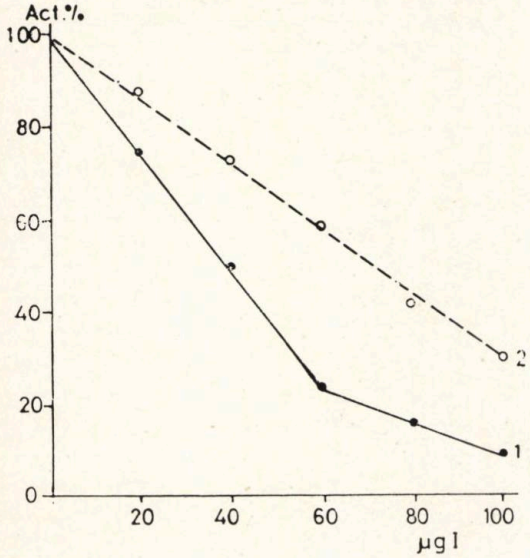


Fig. 3. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht libere (1) și imobilizate (2) în funcție de concentrația inhibitorului izolat din cartof. Concentrația enzimei folosită în probă : 6 μg enzimă liberă și 20 μg enzimă imobilizată (0,025 ml gel enzimatic).

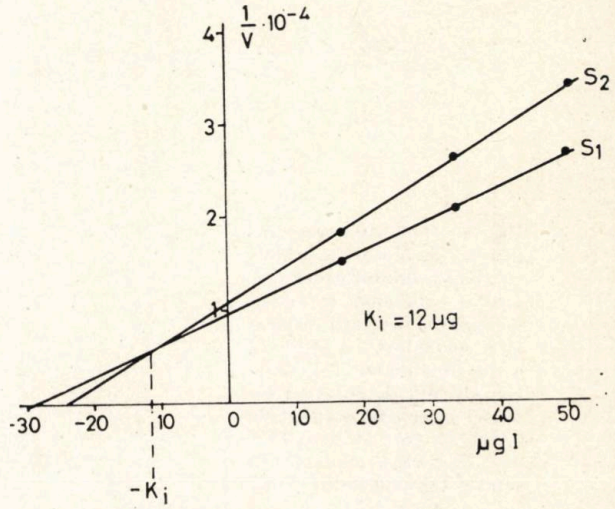


Fig. 4. — Determinarea grafică a constantei de inhibiție (K_I) a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof pentru activitatea proteolitică (substrat cazeină) a α-Cht libere. Cele două soluții de substrat folosite în reacție conțineau 1 % (S_1) și, respectiv, 0,5 % (S_2) cazeină, în tampon borat 0,1 M, pH 8,0.

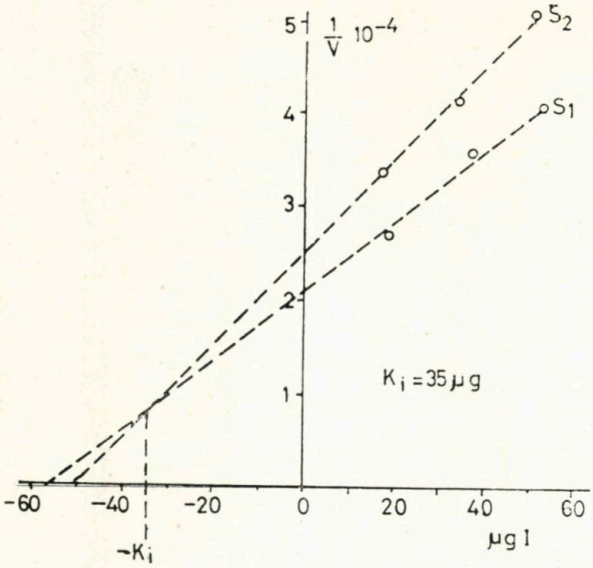


Fig. 5. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie (K_i) a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof pentru activitatea proteolitică a α-Cht imobilizate. Cele două soluţii de substrat folosite în reacţie conţineau 1 % (S_1) şi, respectiv, 0,5 % (S_2) cazeină, în tampon borat 0,1 M, pH 8,0.

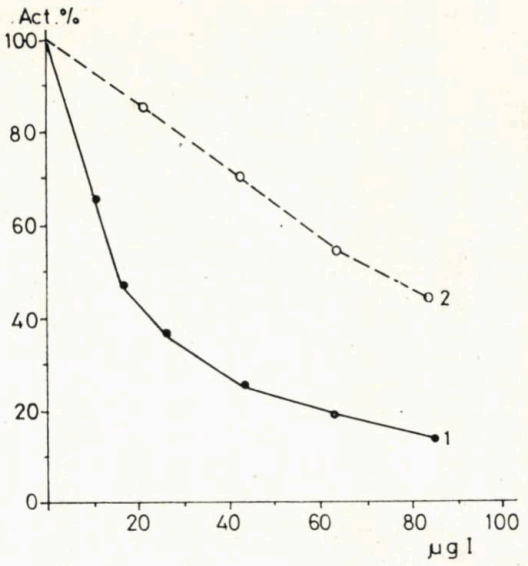


Fig. 6. — Variaţia activităţii esterazice (substrat ATEE) a α-Cht libere (1) şi imobilizate (2) în funcţie de concentraţia inhibitorului izolat din tuberculii de cartof. Cantitatea de enzimă folosită în probă a fost de 6 µg în cazul α-Cht libere şi de 40 µg în cazul α-Cht imobilizate.

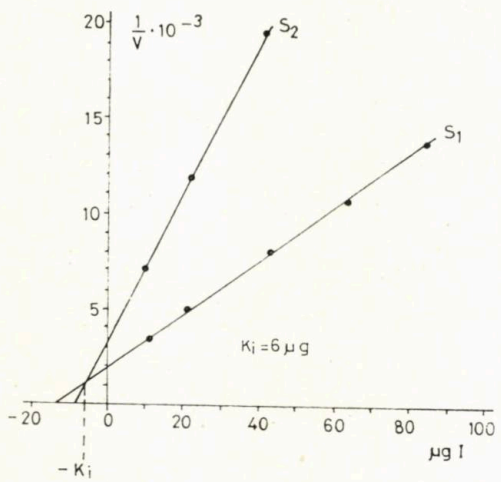


Fig. 7. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie (K_i) a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof pentru activitatea esterazică (substrat ATEE) a α-Cht libere. Cele două concentraţii de substrat folosite în reacţie au fost de 0,0062 M (S_1) şi de 0,0031 M ATEE (S_2), realizate în soluţie tampon fosfat 0,067 M, pH 7,0.

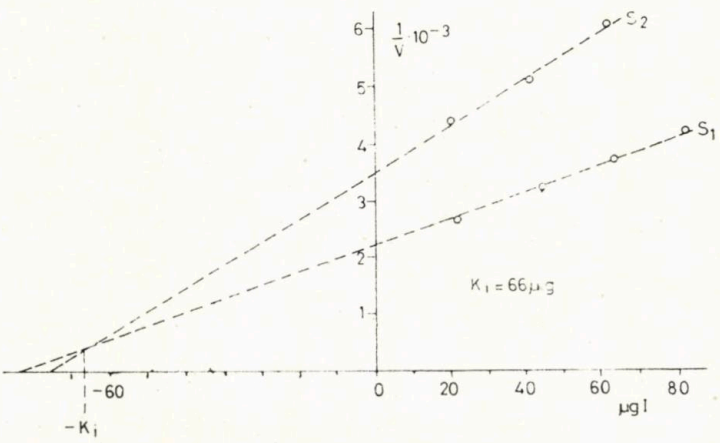


Fig. 8. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie (K_i) a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof în cazul activităţii esterazice (substrat ATEE) a α-Cht imobilizate. Cele două concentraţii de substrat folosite în reacţie au fost de 0,0062 M (S_1) şi de 0,0031 M ATEE (S_2), realizate în soluţie tampon fosfat 0,067 M, pH 7,0.

Această comportare diferită a celor două preparate de enzimă se oglindeşte şi în valorile K_i ale acestui inhibitor pentru α-Cht liberă (fig. 7) şi pentru cea imobilizată (fig. 8), care se situează la 6 şi, respectiv, 66 μg inhibitor/probă. Şi în cazul activităţii esterazice, inhibiţia exercitată de inhibitorul din cartof este de tip competitiv.

În figura 9 se prezintă de asemenea influenţa inhibitorului studiat şi asupra activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate, folosind însă

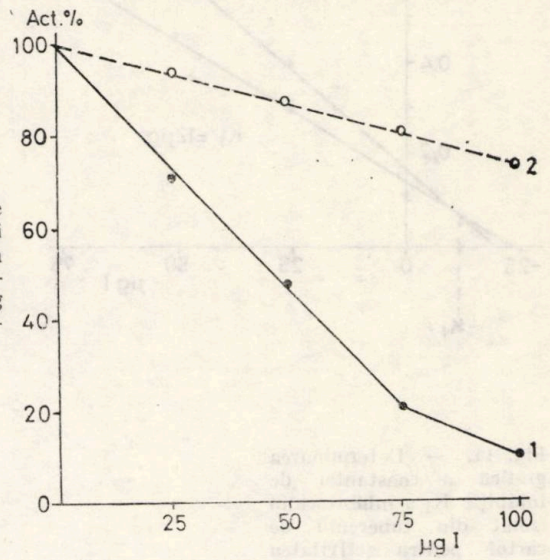


Fig. 9. — Variaţia activităţii esterazice (substrat BTEE) a α-Cht libere (1) şi imobilizate (2), în funcţie de concentraţia inhibitorului izolat din tuberculii de cartof. În mediul de reacţie s-au folosit 6 μg α-Cht liberă, respectiv 40 μg α-Cht imobilizată.

ca substrat BTEE. Se observă şi de data aceasta o scădere a activităţii esterazice la ambele preparate enzimatice cu creşterea concentraţiei inhibitorului din probă, care este de asemenea perfect liniară la enzima imobilizată şi liniară la enzima liberă pînă la o concentraţie de 75 μg inhibitor/probă. Din datele prezentate în figura 9 rezultă totodată şi faptul că stabilitatea α-Cht faţă de acţiunea inhibitorului, observată în urma imobilizării, este maximă la folosirea substratului BTEE. Astfel, în timp ce la o cantitate de 100 μg inhibitor în probă enzima liberă mai prezintă doar un rest de activitate esterazică de 10%, cea imobilizată păstrează în aceste condiţii încă 73% din activitatea ei iniţială.

În figurile 10 şi 11 sînt redate, în sfîrşit, determinările grafice ale valorilor K_i pentru inhibitorul izolat din cartof în cazul activităţii esterazice la α-Cht liberă şi imobilizată. Se constată şi de data aceasta o inhibiţie competitivă şi o creştere considerabilă a valorii K_i — de la 12 la enzima liberă la 150 la cea imobilizată.

Valorile K_i ale inhibitorului izolat, obţinute atît în cazul activităţii proteolitice, cît şi în cel al activităţii esterazice a α-Cht libere şi imobilizate, sînt centralizate în tabela 1. Din datele cuprinse în această tabelă rezultă clar că prin imobilizare α-Cht devine mai stabilă faţă de acţiunea inhibitorului ei izolat din cartof şi că această stabilitate este mult mai pronunţată în cazul activităţii esterazice, unde valorile K_i cresc de 11 şi, respectiv, de 12 ori, spre deosebire de activitatea proteolitică, unde valoarea K_i se măreşte doar de trei ori în urma imobilizării enzimei.

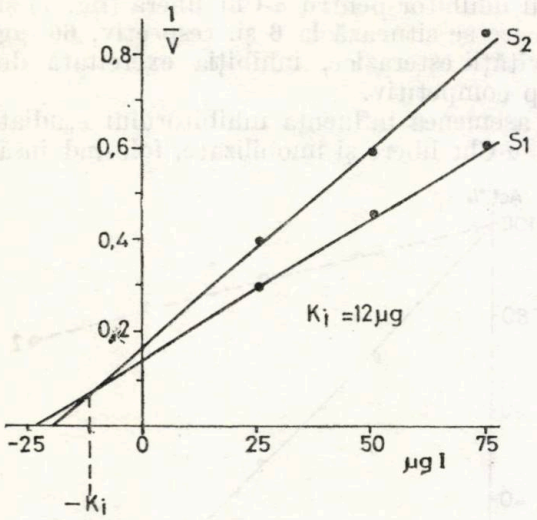


Fig. 10. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie (K_i) a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof pentru activitatea esterazică (substrat BTEE) a α-Cht libere. Concentraţia celor două soluţii de BTEE a fost de 0,0006 M(S_1) şi, respectiv, de 0,0003 M(S_2), realizată în tampon Tris—HCl 0,08 M, pH 7,8 cu $CaCl_2$ 0,1 M.

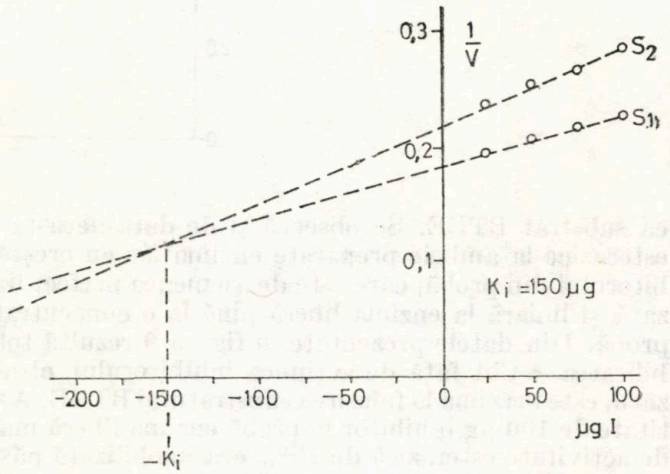


Fig. 11. — Determinarea grafică a constantei de inhibiţie K_i a inhibitorului izolat din tuberculii de cartof pentru activitatea sterazică (substrat BTEE) a α-Cht imobilizate. Concentraţia celor două soluţii de BTEE a fost de 0,0006 M (S_1) şi respectiv, de 0,0003 M (S_2), realizată în tampon Tris—HCl 0,08 M, pH 7,8 cu $CaCl_2$ 0,1 M.

Tabela 1

Constantele de inhibiţie (K_i) ale inhibitorului natural al α-Cht izolat din tuberculii de cartof determinate după metoda grafică a lui Dixon pentru activitatea proteolitică şi esterazică a α-Cht libere şi imobilizate

Preparatul enzimatic folosit	K_i pentru activitatea proteolitică (substrat cazeină) (µg inhibitor/probă)	K_i pentru activitatea esterazică	
		substrat ATEE (µg inhibitor/probă)	substrat BTEE (µg inhibitor/probă)
α-Cht liberă	12	6	12
α-Cht imobilizată	35	66	150

CONCLUZII

1. S-a separat într-o singură treaptă de lucru un inhibitor natural al α-Cht dintr-un extract brut din tuberculi de cartof prin cromatografie de afinitate pe un suport afin format din α-Cht cuplată de agaroză reticulată.

2. Inhibitorul separat se prezintă din punct de vedere electroforetic omogen și se situează la nivelul proteinelor cu o viteză de migrare electroforetică relativ redusă.

3. Inhibitorul izolat exercită o inhibiție competitivă atît asupra activității proteolitice, cît și asupra celei esterazice a α-Cht.

4. Valorile constantelor de inhibiție ale inhibitorului izolat sînt identice sau apropiate la cele două activități catalitice ale α-Cht libere, dar diferă mult între ele la enzima imobilizată, unde creșterea valorii K_i este mult mai pronunțată în cazul activității esterazice decît în cel al activității proteolitice.

5. Suportul afin format din α-Cht imobilizată pe agaroză reticulată poate fi folosit de repetate ori timp de luni de zile, fără să-și piardă din eficiența sa.

Prezentat la redacție
la 15 iulie 1980

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de enzimologie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

ISOLIERUNG EINES NATÜRLICHEN α-CHYMOTRYPSIN-HEMMSTOFFES DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AUS KARTOFFELKNOLLEN UND EINIGE EIGENSCHFTAEN DESSELBEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Isolierung eines α-Chymotrypsin-Hemmstoffes aus Kartoffelknollen-Rohextrakt durch Affinitätschromatographie an trägerfixiertem α-Chymotrypsin beschrieben. Der affine Träger wurde durch kovalente Bindung von α-Chymotrypsin an perlförmiges Gel vernetzter und mit BrCN aktivierter Agarose erhalten und besaß bei einem Enzymgehalt von 0,8 mg α-Chymotrypsin/ml Gel eine proteolytische Restaktivität von 55% (Casein als Substrat) und eine Esteraserestaktivität von 83,6 (Substrat ATEE), bzw. von 84,6% (Substrat BTEE).

Der isolierte Hemmstoff erwies sich als eine elektrophoretisch homogene Proteinfraktion (Polyakrylamid-Gelelektrophorese) mit einer relativ kleinen Wanderungsgeschwindigkeit und übt sowohl auf die proteolytische, als auch auf die Esteraseaktivität eine kompetitive Hemmung aus. Die K_i-Werte des isolierten Hemmstoffes sind beim freien α-Chymotrypsin nahezu identisch für seine beiden katalytischen Aktivitäten, doch recht unterschiedlich beim trägerfixierten Enzym, wo diese Werte wohl im Falle beider Enzymaktivitäten ansteigen, aber bedeutend mehr im

Falle der Esteraseaktivität (11—12 mal), als im Falle der proteolytischen (lediglich 3 mal).

Der affine Träger kann wiederholte Male mit der gleichen Wirksamkeit zur Affinitätschromatographie verwendet werden.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **21**, 199 (1978).
2. P. CUATRECASAS, W. WILCHEK, C. B. ANFINSEN, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., **61**, 636 (1968).
3. F. IONESCU-STOIAN, H. D. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **10**, 113 (1973).
4. H. D. SCHELL, D. COTARIU, O. GOZIA, Rev. roum. Biochim., **11**, 207 (1974).
5. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, I. CORNOIU, AURORA JIFCU, Analit. Letters, **14 B** (1981).
6. E. L. MALOVA, A. I. ŞULMINA, *Khimia proteoliticeskii fermentov*, materialele Simpozionului din 1973, p. 38—39, rezumat în Chem. Abstr., **81**, 3435 V (1975).
7. T. IWASAKI, T. KIYOHARA, M. YOSHIKAWA, J. Biochem. Japan, **70**, 817 (1971).
8. T. KIYOHARA, T. IWASAKI, M. YOSHIKAWA, J. Biochem. Japan, **73**, 89 (1973).
9. J. C. MELVILLE, C. A. RYAN, J. Biol. Chem., **247**, 3445 (1972).
10. J. TURKOVÁ, O. HUBÁLKOVÁ, M. KŘVÁKOVÁ, J. ČOUPEK, Biochim. Biophys. Acta, **322**, 1 (1973).
11. E. V. IEVLEVA, V. V. MOSOLOV, Priklad. Biohim. i mikrobiolog., **11**, 427 (1975).
12. H. D. SCHELL, T. BENŢIA, M. A. MATEESCU, Brevet românesc nr. 65382/1977.
13. R. AXÉN, S. ERNBACK, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).
14. H. D. SCHELL, A. WAHEED, D. BĂNĂŢEANU, M. RABEGA, T. BENŢIA, St. cerc. biochim., **24**, 97 (1981).
15. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
16. M. KUNITZ, J. gen. Physiol., **30**, 291 (1947), în *Methods in enzymology*, sub red. S. P. COLOWICK şi N. O. KAPLAN, Academic Press, Inc., New York, 1955, vol. II, p. 19.
17. W. RICK, în *Methods of enzymatic analysis*, sub red. M. U. BERGMEYER, Academic Press, New York, 1965, p. 800.
18. G. W. SCHWERT, Y. TAKENAKA, Biochim. biophys. Acta, **16**, 570 (1955).
19. P. C. W. HUMMEL, Canad, J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
20. A. SPIRO-KERN, P. S. CHEN, *A chymotrypsin inhibitor from adult Culex pipiens isolated by affinity chromatography*, în *Affinity chromatography*, sub red. O. HOFFMANOSTENHOF, M. BREITENBACH, F. KOLLER, D. KRAFT şi O. SCHEINER, Pergamon Press, Oxford-New York — Toronto — Sydney — Paris — Frankfurt, 1978, p. 119.
21. D. BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, ABDUL WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 135 (1981).
22. D. BĂNĂŢEANU, H. D. SCHELL, ABDUL WAHEED, St. cerc. biochim., **24**, 21(1981).
23. R. L. FOSTER, *The nature of enzymology*, Croom Helm, London, 1980, p. 127.

CERCETĂRI ASUPRA ACTIVITĂŢII LIZOZIMULUI ÎN NEFROPATIA ACUTĂ EXPERIMENTALĂ

MARGARETA ŞERBAN*, C. VLĂDESCU**, CEZARINA CUCU**

Rezumat. S-a urmărit modificarea lizozimului în ţesutul renal, în ser şi urină la iepuri supuşi intoxicaţiei acute renale cu azotat de uranil şi cromat de sodiu. S-a constatat că intensitatea leziunii histologice renale, ca şi a insuficienţei renale, este dependentă de timpul scurs de la momentul intoxicaţiei la cel al sacrificării animalelor. Mecanismul creşterii lizozimuriei constă în încetarea retroresorbţiei tubulare şi, posibil iniţial, într-o eliminare din ţesutul necrozat. Determinarea activităţii lizozimului urinar prezintă utilitate diagnostică în aprecierea gradului de alterare tubulară în patologia renală.

Este cunoscut faptul că multe metale grele introduse accidental în organismul uman sau experimental în cel animal produc insuficienţă renală acută, cu leziuni de necroză tubulară (1), (2), (3).

Distribuţia diferenţiată intrarenală a lizozimului, în sensul unei concentraţii mult mai mari a zonei corticale faţă de cea medulară, a fost descrisă în literatură (4), (5), (6), (7). iar datele de fiziologie rezultate din studii experimentale (8), (9) — (13), (14), (15), (16) atestă rolul rinichiului şi în special al tubilor în metabolizarea lizozimului.

Pentru a putea aprecia utilitatea acestui indicator enzimatic în diagnosticul diferenţial al nefropatiilor, ne-am propus să urmărim comportarea lizozimului seric şi urinar în condiţiile realizării unei insuficienţe renale acute, prin lezare toxică tubulară cu azotat de uranil şi cromat de potasiu.

MATERIAL ŞI METODE

Au fost realizate patru modele experimentale, în care au variat atît doza de toxic, cît şi durata administrării acestuia. S-au folosit în acest scop un număr de 30 de iepuri albi, în greutate de 1 800—2 200 g, împărţiţi în următoarele loturi de cîte 6 animale :

1) lot normal ;

2) lot intoxicat cu azotat de uranil : 2 doze a 10 mg/kg corp, administrate în injecţii intraperitoneale (în 2 zile), animalele fiind sacrificate la 8 ore de la ultima injecţie ;

3) lot intoxicat cu azotat de uranil : 2 doze a 10 mg/kg corp, administrate la fel ca la lotul 2 ; lotul a fost sacrificat la 24 de ore de la ultima injecţie ;

4) lot intoxicat cu cromat de sodiu : o doză unică de 20 mg/kg corp, sacrificarea avînd loc la 24 de ore de la injectare ;

5) lot intoxicat cu cromat de sodiu : 10 doze a 2 mg/kg corp, administrate timp de 10 zile, animalele fiind sacrificate la 24 de ore de la ultima injecţie.

Animalele au fost exsanguinate prin puncţie cardiacă, apoi omorîte prin embolie gazoasă. Au fost prelevate din rinichi fragmente de cortex şi medulă, din care enzima a fost extrasă în mediu apos după tehnica obişnuită folosită în acest scop. S-a practicat îngheţarea — dezghe-

St. cerc. biochim., 24, 2, 189—193 (1981)

ţarea repetată în zăpadă carbonică a omogenatului tisular, pentru o mai bună distribuţie celulară şi pentru eliberarea cantitativă a enzimei din celule. În extractele tisulare astfel obţinute, s-au dozat atît lizozimul cît şi conţinutul proteic, pentru a exprima activitatea enzimatică în unităţi de activitate specifică. În sîngele animalelor respective s-a urmărit concentraţia lizozimului şi a creatininei, iar în urină concentraţia proteinelor alături de concentraţia lizozimului. Metodele de dozare folosite au fost descrise anterior (8). De asemenea, ţesutul renal prelevat la animalele intoxicate a fost supus examenului histopatologic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Concentraţia lizozimului din ţesutul renal, din ser şi din urină, precum şi valorile creatininemiei şi proteinuriei sînt cuprinse în tabela 1.

Tabela 1

Modificările lizozimului renal, seric şi urinar, precum şi nivelul creatininemiei şi al proteinuriei la iepuri intoxicaţi cu azotat de uranil (media valorilor)

Loturi studiate	LIZOZIM		CREATININĂ		PROTEINE	
	ţesut renal, μg/100 mg prot.		ser	urină	ser	urină
	cortex	medulă	μg/ml	μg/ml	mg %	g/l
Lot martor	2 344	424,8	2,5	1	0,8	0
Lot intoxicat cu azotat de uranil (2 doze a 10 mg/kg corp) şi sacrificat la 8 ore de la ultima injecţie	1 255	74	3,9	13,4	4,2	7,11
Lot intoxicat cu azotat de uranil (2 doze a 10 mg/kg corp) şi sacrificat la 24 ore de la ultima injecţie	892	142	48	39	10,55	6,2

Se constată că, după două injecţii intraperitoneale a 10 mg/kg corp de azotat de uranil, la iepurii sacrificaţi după 8 ore de la ultima injecţie apare o intensă proteinurie, însoţită de o creştere semnificativă a creatininei serice. Valoarea lizozimului seric se păstrează în limite normale, fiind însă însoţită de apariţia lizozimului urinar la valori destul de importante (în medie de 13,4 μg/ml).

În ceea ce priveşte concentraţia lizozimului în rinichi, se remarcă o scădere semnificativă a activităţii acestei enzime, mai ales în cortexul renal. Întrucît valorile lizozimului sanguin sînt sub pragul mediu de eliminare urinară, trebuie trasă concluzia că apariţia lizozimului în urină este datorată dispariţiei procesului de retroresorbţie tubulară şi, posibil, eliberării din celulele proximale, procese secundare distrofiei şi necrozei celulelor din tubii contorţi proximali. Cu alte cuvinte, lizozimuria la aceste animale este un indice al suferinţei tubulare.

La animalele intoxicate cu aceeaşi doză de azotat de uranil, dar sacrificate la 24 de ore de la ultima injecţie, se observă apariţia unei proteinurii de aceeaşi valoare ca la lotul precedent. Starea de insuficienţă renală acută, exprimată prin creşterea creatininei sanguine, este mai severă (tabe-

la 1). Valorile lizozimului sînt mult mai crescute, atît în ser cît și în urină. Creșterea lizozimului în sînge este datorată, fără îndoială, insuficienței de filtrare glomerulară, care își găsește expresia și în creșterea creatininei sanguine. Este posibil ca la creșterea lizozimului sanguin să contribuie și resorbția de lizozim din cortexul renal necrozat. Creșterea lizozimului urinar este datorată atît alterării retroresorbției tubulare — necrozei tubilor contorți — , cît și, la animalele care continuă să urineze, filtrării glomerulare a unei cantități mai mari de lizozim.

Dozările de lizozim în rinichi evidențiază o reducere importantă a concentrației acestei enzime în zona corticală comparativ cu concentrația din rinichiul normal, fenomen explicabil prin necroza celulară și prin eliberarea de proteine și enzime în urină și în sînge.

În nefropatia acută după cromat de sodiu, așa cum s-a arătat, intoxicația s-a făcut în două variante experimentale : a) doză unică de toxic (20 mg/kg corp în injecție) intraperitoneală și sacrificare la 24 de ore de la administrare ; b) aceeași doză, dar cu ritmul de administrare schimbat, și anume doza a fost fracționată în 10 injecții zilnice, conținînd fiecare cîte 2 mg/kg corp, iar sacrificarea s-a făcut la 24 de ore de la ultima injecție.

Examenul histopatologic al țesutului renal din primul lot a pus în evidență leziuni caracteristice. La cel de-al doilea lot, supus unei intoxicații mai lente, examenul histopatologic evidențiază leziuni mult mai puțin severe decît cele din intoxicația acută.

Concentrația lizozimului din rinichi, ser și urină la aceste animale intoxicate, precum și nivelul creatininemiei și proteinuriei sînt redate în tabela 2.

Tabela 2

Modificările lizozimului renal, seric și urinar, precum și nivelul creatininemiei și proteinuriei la iepuri intoxicați cu cromat de sodiu (media valorilor)

Loturi Studiate	LIZOZIM		CREATININĂ		PROTEINE	
	țesut renal μg/100 mg prot.		ser μg/ml	urină μg/ml	ser mg %	urină g/l
	cortex	medulă				
Lot martor	2 344	424,8	2,5	1	0,8	0
Lot intoxicat cu cromat de Na (doză unică de 20 mg/kg corp) și sacrificat la 24 ore de la ultima injecție	1 218	624	67,1	642	5	7,02
Lot intoxicat cu cromat de Na (aceeași doză, dar fracționată în 10 inj.) și sacrificat la 24 ore de la ultima injecție	2 170	619	16,75	4,4	1,83	4,4

Se poate constata că administrarea fracționată a cromatului de sodiu în 10 injecții a 2 mg/kg corp este urmată de o alterare mult mai redusă a parametrilor biochimici studiați. Valoarea medie a creatininei sanguine este de 1,83 mg%, iar proteinuria este în medie de 0,42 g/l. În serul sanguin,

lizozimul a atins însă valori de 2—10 ori mai mari decît media lizozimului seric la animalele normale, iar în urină valorile lizozimului au fost între 2 şi 8μg/ml. În ţesutul renal, concentraţia lizozimului nu suferă modificări în raport cu valorile normale.

CONCLUZII

1. Prin injecţie intraperitoneală de azotat de uranil şi de cromat de sodiu apare insuficienţa renală acută, a cărei leziune histopatologică principală este necroza tubilor contorţi proximali.

2. Intensitatea leziunii histologice renale şi a insuficienţei renale este dependentă de timpul scurs de la momentul intoxicaţiei la cel al sacrificării animalelor (mai mare la animalele sacrificate la 24 de ore faţă de cele sacrificate la 8 ore), ca şi de doza zilnică injectată (mai mică în injectarea fracţionată decît în injecţia unică a aceleiaşi doze totale).

3. Lizozimul seric apare crescut proporţional cu gradul insuficienţei renale provocate de intoxicaţie, fiind determinat de scăderea filtrării glomerulare şi, posibil, de resorbţia enzimei filtrate din tubii contorţi necrozaţi.

4. Lizozimul urinar creşte mult, disproporţionat faţă de cel seric şi înainte de apariţia unei creşteri a acestuia peste valorile prag.

5. Mecanismul creşteriilizozimuriei constă în încetarea retroresorbţiei lui tubulare şi, poate iniţial, într-o eliminare din epiteliul necrozat, mărimea leziunii fiind paralelă cu gradul leziunii tubulare.

6. În corticala renală seobservă scăderea concentraţiei lizozimului, determinată de necroza celulelor tubulare.

7. Determinarea activităţii lizozimului urinar este de o certă utilitate diagnostică în aprecierea gradului de alterare tubulară în patologia renală.

Prezentat la redacţie
la 10 aprilie 1981

*I.M.F.-Bucureşti,
Clinica medicală Colentina
şi
** Institutul de medicină internă,
Spitalul clinic Colentina

LYSOZYME ACTIVITY IN EXPERIMENTAL ACUTE NEPHROPATHY

SUMMARY

Some changes induced by acute renal experimental intoxication are reported upon the lysozyme activity in the renal tissue, the blood serum and urine. The high urine lysozyme values are correlated with the renal histologic lesion intensity and the intoxication time. The mechanism of rise of urinary lysozyme activity and the diagnostic applicability are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. T. BALAZST, R. ROEPKE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **123**, 380 (1966).
2. K. NOMIYANAMA, E. C. FOULKES, Toxicol. appl. Pharmacol., **13**, 89 (1968).
3. G. E. SCHUBERT, K. GEBARD, F. HONLEIN, Arch. Path. Anat., **68**, 351 (1970).
4. T. V. L. BIBER, M. MYLLE, A. D. BAINS, C. N. GOTTSCHALK, J. OLIVER, Amer. J. Med., **44**, 664 (1968).
5. I. BRUCKNER, G. STOICA, MARGARETA ȘERBAN, în *The Balkan Nephropathy*, Ciba foundation study group n. 30, J. & A. Churchill, 1967, p. 84.
6. I. BRUCKNER, MARGARETA ȘERBAN, Rev. roum. Méd. int., **6**, 153 (1969).
7. I. BRUCKNER, MARGARETA ȘERBAN, Méd. int., **18**, 149 (1980).
8. I. BRUCKNER, MARGARETA ȘERBAN, E. NICHIFOR, Rev. roum. Méd. Int., **6**, 457 (1973).
9. C. DAVIS, Postgrad. Med., **49**, 51 (1971).
10. A. GAJDOS, Presse méd., **79**, 351 (1971).
11. J. F. HARISSON, G. S. LUNT, P. SCOTT, J. D. BLAYNAY, Lancet, **1**, 371 (1968).
12. J. P. HAYSSLET, P. E. PERILLIE, S. C. FINCH, New Engl. J. Med., **279**, 506 (1968).
13. R. E. NOBLE, H. D. BRAINERD, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **120**, 737 (1965).
14. E. F. OSSERMAN, în *Proteins in normal and pathological urine*, sub red. MANUEL, REVILLARD, BETUEL, S. Karger, Basel-New York, 1970.
15. D. J. PROCKOP, W. D. DAVIDSON, New Engl. J. Med., **270**, 269 (1964).
16. J. P. WAUTERS, H. FAVRE, Schweiz. med. Wschr., **100**, 1903 (1970).

INTERFERENŢA AZIDEI DE SODIU CU REACTIVUL FOSFOVANILINIC ÎN METODA DE DOZARE A LIPIDELOR SERICE

C. VLĂDESCU, EMILIA MURARIU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ŞERBAN

Rezumat. Autorii şi-au propus elucidarea mecanismului posibil al interferenţei dintre reactivul fosfovanilinic, folosit la dozarea lipidelor serice, şi azida de sodiu. Din rezultatele obţinute se consideră că reacţia de culoare urmărită are loc la sediul dublei legături a alchenil cationului format în molecula acizilor graşi nesaturaţi din constituţia lipidelor serice. Inhibarea acestei reacţii în prezenţa azidei se datoreşte unei posibile competiţii între vanilină şi azidă la nivelul acestui sediu de reacţie în mediu protonat.

În cercetări anterioare[1] am semnalat scăderea valorii concentraţiei lipidelor serice pentru serurile conservate pe azidă de sodiu faţă de valoarea acesteia în serul nativ (fără conservant) atunci cînd pentru dozarea lipidelor se utilizează una din variantele metodei cu fosfo-sulfovanilină.

În literatură există o serie de cercetări care menţionează interferenţe între diferitele metode de dozare a unor componente biochimice şi azida de sodiu (1), (2).

În lucrarea de faţă ne-am propus elucidarea, măcar parţială, a mecanismului posibil al interferenţei azidei de sodiu cu tehnica amintită.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru dozarea lipidelor am folosit tehnica ce utilizează reactivul fosfovanilinic (3) atît pentru seruri cît şi pentru soluţii pure de acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi. Dozarea s-a efectuat pe produsele respective înainte şi după adăugarea conservantului. S-a lucrat pe trei pooluri de ser cu concentraţii diferite de lipide : 610, 750 şi, respectiv, 1150 mg%. Fiecare din aceste amestecuri de ser au fost divizate în două părţi, într-una din ele adăugîndu-se azidă în concentraţie de 1%. Prin diluarea corespunzătoare a serului conţinînd azidă 1% cu serul nativ, s-a obţinut o scară de diluţii între 0 şi 1 g% azidă pe ml ser. În aceste seruri cu concentraţie variată în azidă şi în serurile native s-a determinat concentraţia de lipide pe cîte cinci probe paralele.

Pentru acizii graşi puri s-au folosit concentraţii astfel alese încît să se poată determina coeficientul de extincţie corespunzător unei soluţii mM. Au fost folosiţi acizii oleic, palmitoleic şi linoleic ca acizi graşi nesaturaţi şi acizii butiric, β-hidroxibutiric, palmitic şi stearic ca acizi graşi saturaţi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din tabela 1 se constată că, odată cu creşterea concentraţiei de azidă în ser, se produce şi o scădere în concentraţia de lipide, indiferent de concentraţia iniţială a lipidelor din serul nativ. Procentul de pierdere a lipi-

[1] Margareta Şerban, C. Vlădescu, Cezarina Cucu, Emilia Murariu, date nepublicate, 1980.

delor serice variază de la 11% pentru o concentraţie de 0,001% pînă la aproximativ 80% pentru o concentraţie în azidă de 1%. Concentraţia de 0,1% azidă, folosită frecvent în conservarea serurilor de control, duce la o pierdere a valorii concentraţiei lipidelor de aproximativ 50%.

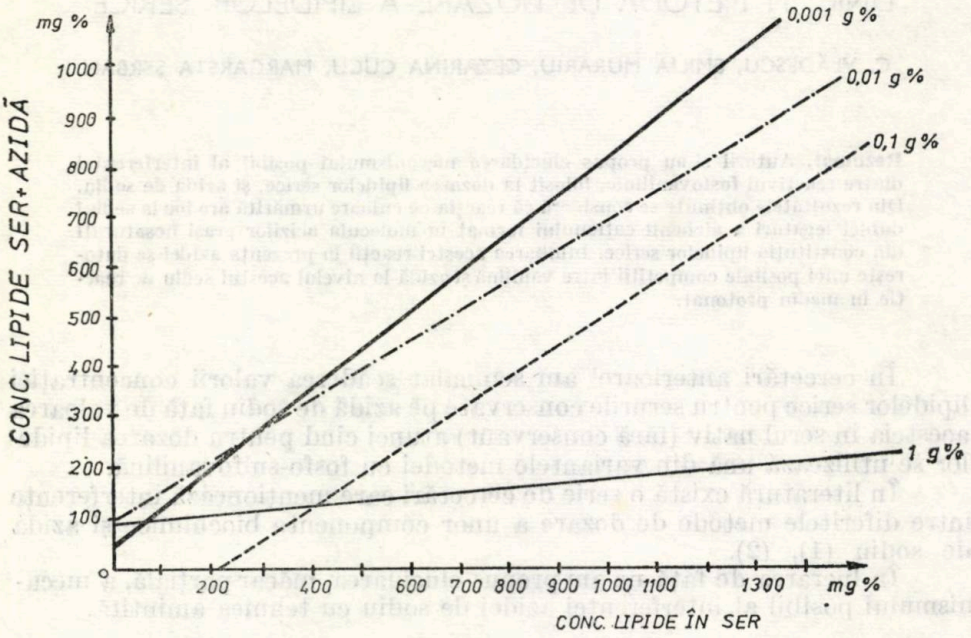


Fig. 1. — Variaţia concentraţiei lipidelor în seruri cu concentraţii diferite de azidă, în raport cu serul nativ.

Tabela 1

Variaţia concentraţiei lipidelor în serurile tratate cu diferite concentraţii de azidă

Concentraţie în azidă g%	LOT I		LOT II		LOT III	
	lipide mg %	% pierdere	lipide mg %	% pierdere	lipide mg %	% pierdere
0	610	—	750	—	1150	—
0,001	540	11	670	11	930	19
0,005	530	13	660	12	840	27
0,01	470	23	500	33	800	30
0,05	350	43	480	36	780	32
0,1	280	51	340	55	630	45
0,5	160	74	170	77	280	68
1,0	160	74	140	81	190	83

Din exprimarea grafică a acestor date se constată creşterea pantei dreptelor ce reprezintă variaţia valorilor de lipide în funcţie de cantitatea de azidă adăugată la ser (fig. 1). Cea mai mare pantă o are dreapta rezultată din concentraţia lipidelor din serul cu 1% azidă de sodiu.

Folosind valorile obținute din serurile native și din cele cu concentrații variabile de azidă, am calculat pierderea procentuală a concentrației lipidelor. Din figura 2 se constată înscrierea acestor valori pe curbe de tip parabolic. Aceste curbe prezintă o concentrație de saturare în azidă

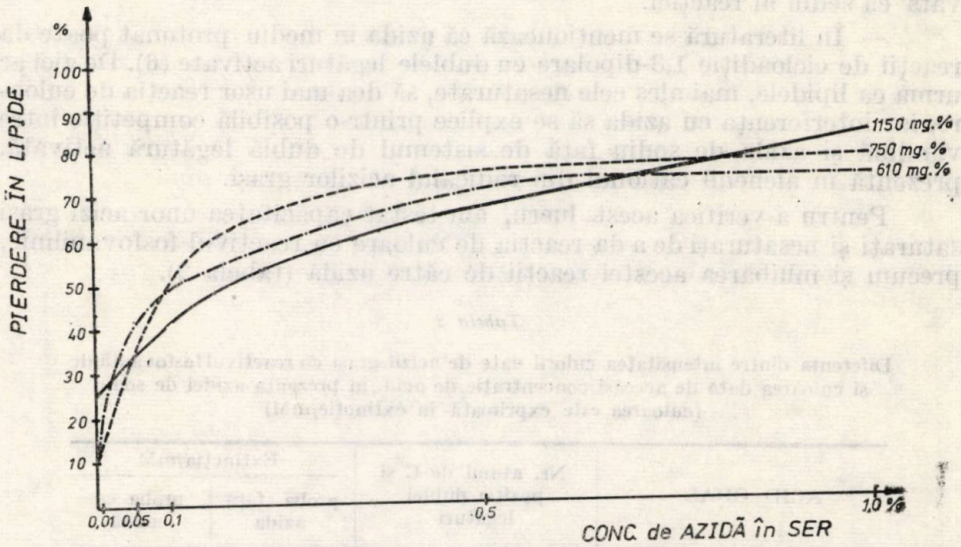


Fig. 2. — Curba de pierdere în concentrația de lipide în funcție de concentrația de azidă adăugată la ser.

peste care scăderea concentrației lipidelor rămîne practic nesemnificativă pentru toate cele trei concentrații inițiale de lipide. Aceste pierderi în concentrația de lipide ar sugera o posibilă reacție între azida de sodiu și unul din componenții mediului de reacție. Pentru a putea explica acest lucru, am luat în considerare următoarele ipoteze:

a. Azida de sodiu reacționează cu reactivul fosfovanilinic, respectiv cu aldehida vanilică, care este un compus carbonilic. Presupunerea ne-a fost sugerată de date din literatură care consemnează reacții între compuși carbonilici și azidă în mediu protonat, reacțiile fiind descrise însă numai pentru cetone. Aceste reacții ar avea ca rezultat formarea unor amide substituite printr-o reacție de transpoziție Beckmann (4). În baza acestei ipoteze ar trebui ca dublarea cantității de vanilină în reactiv să redreseze reacția de culoare, deoarece în mediul de reacție raportul molar între azidă și vanilină este în favoarea vanilinei cu un ordin de mărime (concentrația vanilinei este de aproximativ 6.10^{-2} mM, iar a azidei de sodiu de 2.10^{-3} mM). Folosind reactiv de concentrație dublă în vanilină, nu am obținut redresarea reacției de culoare, deci nu am putut confirma această ipoteză.

b. A doua explicație posibilă ar putea fi dată de faptul că azida de sodiu poate reacționa cu un produs intermediar, respectiv cu acizii grași conținuți în complexul lipidic. Această presupunere pleacă de la două fapte descrise în literatură:

— Johnson și colab. (5), explicînd mecanismul de reacție a lipidelor cu reactivul fosfovanilinic, propun desfășurarea acestei reacții ca avînd

loc în două etape : prima, de formare a unui cromogen, un alchenil cation cu o dublă legătură activată ($-\overset{+}{C}H-CH=CH-$), urmată de formarea cromoforului propriu-zis, un compus de reacţie între acest alchenil cation şi aldehida vanilică, compus în care este implicată dubla legătură activată ca sediu al reacţiei.

— În literatură se menţionează că azida în mediu protonat poate da reacţii de cicloadiţie 1,3-dipolare cu dublele legături activate (6). De aici ar urma ca lipidele, mai ales cele nesaturate, să dea mai uşor reacţia de culoare, iar interferenţa cu azida să se explice printr-o posibilă competiţie între vanilină şi azida de sodiu faţă de sistemul de dublă legătură activată, prezentă în alchenil cationul din radicalul acizilor graşi.

Pentru a verifica acest lucru, am testat capacitatea unor acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi de a da reacţia de culoare cu reactivul fosfovanilinic, precum şi inhibarea acestei reacţii de către azidă (tabela 2).

Tabela 2

Diferenţa dintre intensitatea culorii date de acizii graşi cu reactivul fosfovanilinic şi culoarea dată de aceeaşi concentraţie de acid, în prezenţa azidei de sodiu (culoarea este exprimată în extincţie/mM)

ACID GRAS	Nr. atomi de C şi poziţia dublei legături	Extincţia/mM	
		proba fără azida	proba cu azidă
Acid oleic	C_{18}, Δ9	$425 \cdot 10^{-3}$	$12,5 \cdot 10^{-3}$
Acid palmitoleic	C_{16}, Δ9	$350 \cdot 10^{-3}$	$11,4 \cdot 10^{-3}$
Acid linoleic	C_{18}, Δ9,12	$345 \cdot 10^{-3}$	14.10^{-3}
Acid butiric	C_4 —	$8 \cdot 10^{-3}$	$2,10^{-3}$
Acid β-hidroxibutiric	C_4 —	$7,2 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$
Acid palmitic	C_{16} —	$20 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-3}$
Acid stearic	C_{18} —	23.10^{-3}	$7,7 \cdot 10^{-3}$

Se observă că contribuţia la reacţia de culoare a lipidelor cu reactivul fosfovanilinic este foarte mare în cazul acizilor graşi nesaturaţi şi nesemnificativă pentru cei saturaţi. De asemenea, şi inhibarea reacţiei de culoare în prezenţa azidei este puternică numai în cazul acizilor graşi nesaturaţi, inhibare care ajunge pînă la aproximativ 96 % din valoarea iniţială pentru o concentraţie de azidă de 1 %.

Aceste observaţii susţin ipoteza după care reacţia de culoare dezvoltată are loc la sediul dublei legături a alchenil cationului format în molecula acidului gras, iar inhibarea acestei reacţii în prezenţa azidei se datoreşte unei posibile competiţii între vanilină şi azidă la nivelul acestui sediu de reacţie în mediu protonat.

CONCLUZII

1. Reacţia de dozare colorimetrică a lipidelor serice cu reactiv fosfovanilinic interferă cu azida de sodiu, introdusă obişnuit în serurile de control, în scop de conservare.

2. Reacția de culoare între lipide și reactivul fosfovanilinic se datorește acizilor grași nesaturați care intră în compoziția lipidelor serice.

3. Inhibarea reacției de culoare de către azida de sodiu depinde de concentrația azidei adăugate și se poate datora unei posibile reacții între azidă și unul din intermediarii formați din moleculele acizilor grași nesaturați în mediul de reacție. Această inhibiție apare deci ca o competiție între azidă și vanilină față de acești intermediari de reacție.

Prezentat la redacție
la 10 aprilie 1981

Institutul de medicină internă
„N. Gh. Lupu"

INTERFERENCE OF NATRIUM AZIDE WITH PLASMATIC LIPID DETERMINATION

SUMMARY

The interference between natrium azide and phosphovaniline in the determination of serum lipids is reported. A possible competitive reaction between natrium azide and vaniline at a reactive site of unsaturated fatty acids is proposed.

BIBLIOGRAFIE

1. TSAN Z. LIU, H. KHAYAM BASHI, Clin. Chem., **23**, 581 (1977).
2. H. KHAYAM BASHIC. SIMS, A. C. PARECH Clin. Chim. Acta, **66**, 69 (1976).
3. E. WOODMANN, D. PRICE, Clin. Chim. Acta, **38**, 39 (1972).
4. EMILIA BĂRBULESCU, N. BĂRBULESCU, C. GREF, *Reacții ale compușilor organici*, Edit. tehnică, București, 1972, p. 497.
5. K. R. JOHNSON, G. ELLIS, C. TOOTHILL, Clin. Chem., **23**, 1669 (1977).
6. C. D. NENIȚESCU, *Chimie organică*, vol. I, Edit. didactică și pedagogică, București, 1966, p. 601.

REFERAT GENERAL

FACTORUL DE CREŞTERE AL NERVULUI

ELISABETA MIHĂILESCU

Introducere
Surse de NGF *in vivo* şi *in vitro*

a. Glandele submaxilare de şoarece mascul adult
b. Glandele de venin
c. Glanda prostată
d. NGF din ser
e. Alte surse de NGF

Structura NGF, diversele forme moleculare

a. 7 s NGF
b. 2,5 s NGF
c. HMW NGF

Proprietăţile fizico-chimice ale NGF
Proprietăţile biologice

a. Rolul NGF în supravieţuirea neuronilor receptivi
b. Efectele generale de creştere produse de NGF
c. Rolul NGF în stimularea şi menţinerea diferenţierii neuronilor receptivi
d. Efectul chemotactic al NGF
e. Rolul NGF ca mediator de informaţie trofică
f. Acţiunea NGF asupra unor celule neneuronale în cultură
g. Activitatea enzimatică a NGF

Mecanismul de acţiune al NGF
Încheiere

INTRODUCERE

Factorul de creştere al nervului (Nerve Growth Factor — NGF) este un complex proteic necesar pentru dezvoltarea şi supravieţuirea neuronilor sistemului nervos simpatic şi unor neuroni senzitivi (1), (2), (3),(4).

Descoperirea NGF este urmarea unor investigaţii generale privind influenţa pe care o au organele terminale asupra structurilor nervoase ce le inervează (5), (6).

În experimente privind implantarea de fragmente de sarcom 180 sau sarcom 37 în peretele corpului unui embrion de găină de 3 zile, s-a

observat o creştere marcantă a dimensiunii ganglionilor spinali senzitivi din rădăcinile dorsale (Dorsal Root Ganglia — DRG) şi a ganglionilor simpatici ai gazdei, stimulaţi în hiperinervarea ţesutului parazit (1), (5).

S-a raportat că atît sarcomul 180, cît şi sarcomul 37 pun în libertate un factor de creştere difuzibil, care, fiind preluat de sîngele circulant al gazdei, este răspunzător de creşterea excesivă a ganglionilor şi de o distribuţie atipică a fibrelor nervoase (7), (8).

Mai tîrziu, continuîndu-se cercetările, s-au descoperit două surse foarte bogate în acest factor : veninul de şarpe şi glandele submaxilare de şoarece mascul adult (1), (9), (10).

Proprietăţile biologice ale NGF, acţiunea exercitată asupra celulelor ţintă, sursele sale, mecanismul de acţiune şi semnificaţia biologică au fost studiate în amănunţime.

SURSE DE NGF *IN VIVO* ŞI *IN VITRO*

NGF a fost identificat într-o mare varietate de ţesuturi ale vertebratelor (1), (2), (3), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18).

Totuşi, valorile detectate pînă în prezent sînt scăzute în cea mai mare parte din ţesuturi (de ordinul a cîtorva ng/mg de proteine), excepţie făcînd doar glandele submaxilare de şoarece mascul matur Swiss Webster albinos (1), veninul a trei familii de şerpi veninoşi — *Crotalidae*, *Viperidae* şi *Elapidae* (10) — şi glanda prostată de cobai (11).

Cantităţile crescute găsite în aceste trei surse sînt considerabil mai mari decît valorile active fiziologic ale proteinei NGF. Aceste concentraţii mari de NGF probabil nu sînt legate de acţiunea proteinei asupra sistemului nervos (4).

Cel mai mult studiate au fost NGF de şoarece (mouse NGF—mNGF) şi din veninul de şarpe (snake NGF—sNGF), dar de curînd a fost caracterizat şi NGF uman (human NGF—hNGF), izolat şi purificat din placenta umană la termen (12), (13).

Se pare că există o similitudine în structura şi în proprietăţile NGF la toate vertebratele (4), (14).

Desigur că există variaţii structurale semnificative, în special la nivel cuaternar, între moleculele de NGF izolate de la diferite specii de vertebrate şi cele izolate din diferite ţesuturi chiar din acelaşi organism (4).

a. **Glandele submaxilare de şoarece mascul adult** reprezintă pînă în prezent cea mai studiată sursă de NGF, în care NGF se găseşte în proporţie de 0,3—5 mg/g greutate umedă (cam 1% din proteinele solubile ale glandei şi în jur de 56 000 BU[1] NGF/g greutate umedă) (1), (3), (11).

Concentraţia de NGF este aproximativ de 10 ori mai mare în glanda submaxilară de şoarece mascul decît în glanda de femelă (1).

---

[1] BU—unitate biologică, unitatea de evaluare a activităţii specifice a NGF, reprezentînd minimul de concentraţie necesar pentru a produce un răspuns biologic maxim în 12—24 ore de incubare a ganglionilor senzitivi embrionari sau a ganglionilor simpatici cu NGF purificat (14), (19).

NGF, absent din glandele submaxilare de șoarece nou-născut, apare doar la pubertate.

Dar, deși glandele submaxilare de șoarece reprezintă locul de sinteză al NGF (1) și cel mai mare depozit de NGF la acest animal, sialectomia, adică extirparea chirurgicală a glandelor submaxilare, nu produce un efect advers în ceea ce privește ganglionii simpatici, așa cum ar fi de așteptat dacă această glandă l-ar produce ca hormon. De asemenea, deși conținutul de NGF diferă la cele două sexe, ganglionii simpatici ai șoarecelui mascul și cei ai femelei au aceeași mărime.

Se presupune că prezența NGF în glanda submaxilară ar fi legată de digestie sau de alte funcții ale glandei, cum sînt producerea și punerea în libertate de substanțe toxice în salivă. Această ipoteză ar fi plauzibilă și pentru faptul că NGF se găsește și în veninul de șarpe.

L. J. Wallace și L. M. Partlow (20), în 1976, și Richard Murphy și colab. (16), (17), în 1977, au arătat că în saliva de șoarece sînt secretate cantități foarte mari de NGF. Deci, glanda submaxilară de șoarece are o funcție exocrină, ea producînd *in situ* NGF (1), iar secreția de NGF este reglată de testosteron.

Glandele salivare ale altor mamifere, cum ar fi șobolanul, cobaiul, vaca, porcul, iepurele și chiar omul, nu conțin NGF (21).

b. **Glandele de venin** ale unor șerpi (3), (10), (18), (22), (23) și cele ale speciilor *Gila monster* și *Heloderma horridum* (24), omoloage glandelor salivare, produc cantități apreciabile de NGF în venin.

Alte veninuri, cum sînt cele de albine, scorpioni, păianjeni, nu conțin NGF (3).

c. **Glanda prostată** a unor mamifere (cobai, iepure, taur) conține NGF în cantități apreciabile. Astfel, glanda prostată de cobai (3), (11) are NGF în proporție de 1,8 $\pm$0,5 mg NGF/g greutate umedă.

Glanda prostată de șoarece, șobolan, hamster și om nu are NGF (3).

Alte organe sexuale masculine nu conțin cantități detectabile de NGF, deși cantitatea mare de NGF din unele țesuturi depinde de hormonii sexuali steroizi (15).

Ca și NGF din glanda submaxilară de șoarece, NGF prostatic este secretat exocrin în lichidul seminal. La taur, lichidul seminal conține cam 178 000 BU NGF/ml, reprezentînd 1—2% din proteinele totale.

Lichidul seminal uman și de porc nu prezintă activitate NGF (3).

Semnificația prezenței în glandele accesorii organelor sexuale a unor agenți cu efecte atît de puternice asupra sistemului nervos simpatic nu este clară, dar este probabil ca NGF să aibă și alt rol fiziologic, legat de funcția sexuală (25).

d. **NGF din ser.** Serul tuturor mamiferelor, inclusiv omul, are în compoziția sa și această proteină — NGF — sub formă de urme (2), (26).

În serul de șobolan și de șoarece, prin metode radioimunologice s-au detectat cam 5 ng NGF/ml ser.

Prin metoda biologică s-au detectat cantități mai mari de NGF, dar s-a evidențiat faptul că această discrepanță se datorește legării NGF de componentele serului (26). Nu s-a identificat pînă în prezent componenta răspunzătoare de legarea NGF. De asemenea nu se cunoaște rolul

fiziologic al legării NGF de proteinele serice şi nici dacă NGF legat este inactivat sau nu.

Aceste proteine care leagă NGF s-ar putea să existe şi în alte ţesuturi, influenţînd distribuţia acestuia în acele ţesuturi (26).

e. **Alte surse de NGF.** Prin teste biologice şi imunologice s-a identificat NGF într-o varietate de alte ţesuturi. Astfel, inima, rinichiul, timusul, diafragma, uterul, vasul deferent, splina, ficatul (4), creierul de peşte (3), creierul de hamster (3), (14), ganglionii simpatici conţin NGF.

Factorul de creştere al nervului a fost detectat şi în unele ţesuturi tumorale, de pildă în granulomul de şoarece şi de şobolan (1) şi în gliom (27).

Rita Levi Montalcini a arătat că şi în serul copiilor cu neuroblastom sau fibrosarcom se găsesc cantităţi crescute de NGF în comparaţie cu serul copiilor sănătoşi (1).

S-a raportat că numeroase celule în cultură (4), cum ar fi celulele L, $3T_3$ (28), SV_{40} $3T_3$, fibroblastele primare (29), celulele de neuroblastom, de melanom, de gliom, de glioblastom, mioblastele şi fibroblastele sinoviale, produc NGF.

Compararea valorilor de NGF din aceste ţesuturi în cultură cu valorile din aceleaşi ţesuturi *in vivo* a demonstrat că producerea *in vitro* de NGF este un răspuns la condiţiile de cultură (30).

STRUCTURA NGF, DIVERSELE FORME MOLECULARE

În funcţie atît de procedeele de izolare şi purificare, cît şi de surse, au fost obţinute diverse forme moleculare de NGF.

În general, activitatea NGF poate fi asociată cu patru proteine, diferite ca mărime :

1) β NGF, cu coeficient de sedimentare 2,5s
2) αβ NGF, cu coeficient de sedimentare 4,5s
3) βγ NGF, cu coeficient de sedimentare 6,5s
4) αβγ NGF, cu coeficient de sedimentare 7s

Primele două forme au fost obţinute de S. Cohen şi colab. (7).

a. **7 s NGF.** E. M. Shooter şi colaboratorii săi au studiat (7s NGF)n, oligomer format din trei subunităţi : α, β γ, heterogene şi ele la rîndul lor.

Preparatele de NGF conţin multiple specii de 7s NGF, cu aceeaşi compoziţie generală, dar diferind tipurile de subunităţi pe care le conţin (30), (31), (32), (33), (34), (35).

Complexul 7s NGF este stabil la valori de pH cuprinse între 5 şi 8 (31) ; la valori extreme de pH disociază în subunităţile sale componente pentru a se regenera spontan, prin recombinarea celor trei subunităţi, la pH neutru.

Complexul 7s NGF, cu greutatea moleculară în jur de 130 000 (2), este format din două subunităţi α, fiecare cu greutatea moleculară de aproximativ 26 500 (35), două subunităţi γ, cu greutatea moleculară de 26 000 (36), şi subunitatea β, care este un dimer cu greutatea moleculară de 26 518 (34). Proporţia dintre subunităţi este de 40 :40 :20.

Subunitatea α, neutră, este formată din trei componente majore şi una minoră (α_1, α_2, α_3, α_4) cu mobilitate electroforetică diferită (31), (35).

Fiecare dintre cele patru specii de subunități α are aceeași greutate moleculară și conține două lanțuri polipeptidice de mărime diferită, α^H și α^L, legate împreună prin punți disulfidice (35).

Nu s-a desemnat o activitate specifică biologică pentru subunitatea α. Se pare că are un rol trofic pentru neuroni și pentru celule neneuronale, produce supraviețuirea lor în condiții de stress mecanic și reglează activitatea celorlalte două subunități, β și γ (35).

Studii imunologice au evidențiat că există un grad considerabil de similitudine structurală între subunitatea α și γ (35).

Subunitatea β este singura care prezintă activitate NGF, adică de creștere exagerată a prelungirilor neuronale. Ea are proprietăți bazice și, spre deosebire de subunitatea γ, subunitatea β izolată are o activitate mai mică decît ca parte a complexului 7s NGF.

Liberă, are tendință de a precipita cu timpul și deci de a-și pierde activitatea biologică.

Subunitatea γ, enzimă asemănătoare tripsinei, cu activitate arginin-esteropeptidazică, este o serinprotează acidă. Este formată din trei componente de aceeași mărime : γ^1, γ^2, γ^3, avînd capacitatea de a se recombina cu subunitățile α și β. Toate cele trei componente ale subunității γ au aceeași activitate specifică.

Subunitatea γ prezintă o activitate enzimatică mai mică în cadrul complexului 7s NGF decît s-ar putea aștepta din punct de vedere stoechiometric.

O serie de cercetători (37), (38), (39) au arătat că funcția subunității γ este de a converti o subunitate pro β într-o subunitate β activă.

Compoziția în subunitatea γ variază în preparate și se schimbă după depozitare la rece în mai puțin de o săptămînă, cu scăderea cantitativă a subunităților γ^1, spre deosebire de compoziția în subunitatea α, care este relativ constantă de la preparat la preparat și după depozitare la rece pînă la o lună de zile (40).

Subunitățile α și γ individuale nu interacționează în absența subunităților β.

Recombinarea subunităților α, β și γ duce la o activitate biologică mai mare decît cea dată de subunitatea β biologic activă.

Proteina 7s NGF, ca și hemoglobina, este într-un echilibru mobil cu subunitățile sale (41).

Complexul 7s NGF este de fapt o metal-proteină cu zinc în proporție de 1—2 g de atomi de Zn pe fiecare moleculă de 7s NGF și cu urme de ioni de metale, ca Fe, Mn, Cu, Mo, Ni.

Afinitatea complexului 7s NGF pentru ionul de Zn este de cîteva ori mai mare decît afinitatea oricărei subunități izolate (42).

Nu se cunosc situsurile de legare ale ionului de Zn la 7s NGF. Liganzii s-ar putea să fie moleculele de apă (42).

Numeroase lucrări au demonstrat că există o similitudine structurală între hexamerul Zn-insulină și (7s NGF)n (34), (37), (38), (43), (44).

Avînd în vedere această analogie, s-ar putea ca ionul de Zn să joace în NGF același rol structural și funcțional ca și la insulină (44), unde controlează conversia proinsulinei în insulină și are rol important în stocarea și punerea în libertate a hormonului din celulele β ale pancreasului (45).

A.M.J. Au şi M. F. Dunn (42) au arătat, în 1977, că activarea enzimatică a (7s NGF)n se face printr-un mecanism endogen chelator de Zn, presupunînd că activitatea proteolitică a enzimei şi punerea în libertate a subunităţilor α şi/sau β sînt reglate *in vivo* printr-un mecanism similar (44).

b. **2,5s NGF** este un dimer compus din două lanţuri polipeptidice identice legate necovalent. Fiecare lanţ este compus din 118 aminoacizi cu trei legături disulfidice intracatenare (34), (37), (38), (39), (46).

Proteina nu prezintă grupări SH libere şi are o oarecare rigiditate în structura moleculară. NGF din venin conţine aproximativ 20% glucide.

La proteina nativă, gruparea aminoterminală este serina şi cea carboxiterminală arginina, dar, prin procedee de izolare şi purificare şi datorită enzimelor din glanda submaxilară, proteina suferă clivaje proteolitice specifice la ambele capete ale lanţurilor polipeptidice (39), (44), (47), (48), (49).

Aceste clivaje enzimatice nu au loc în complexul 7s NGF, care conferă protecţie subunităţilor sale β.

Clivarea argininei de la capătul carboxiterminal are loc la ambele lanţuri ale dimerului şi în acest caz subunitatea β NGF este împiedicată de a se reasocia cu subunităţile α şi γ pentru regenerarea complexului 7s NGF.

Îndepărtarea octapeptidei NH terminale are loc doar la un monomer, nu la ambele lanţuri.

S-au studiat aceste clivaje (39), (47), (48) şi s-a observat că ele nu influenţează activitatea biologică a β NGF (3).

2,5s NGF este de fapt β NGF nativ, care a suferit clivaje enzimatice la capătul COOH terminal prin izolare şi purificare.

Resturile de arginină COOH terminale ale β NGF reprezintă o condiţie esenţială pentru stabilitatea 7s NGF, întrucît ele se leagă specific de situsul activ al subunităţii γ, enzimă arginin-esteropeptidazică ce clivează un pro β NGF în β NGF funcţional activ.

Subunitatea γ enzimatică rămîne legată de produsul său după hidroliza legăturii peptidice şi este legată şi de subunitatea α (41).

Subunităţile α şi ionii de Zn se pot asocia cu pro β NGF înainte de clivaj sau cu complexul γβ după clivaj, rezultatul final fiind formarea 7s NGF (2).

c. **HMW NGF.** În 1978, M. Young şi colab (50) au evidenţiat că în extractele crude de glande submaxilare de şoarece există multiple forme moleculare de NGF.

Prin folosirea unor procedee variate cromatografice şi electroforetice s-au obţinut cel puţin şase forme diferite de NGF, dintre care doar una, HMW NGF(High Molecular Weight Nerve Growth Factor), cu greutate moleculară de 116 000, este foarte stabilă în diluţii de ordinul ng/ml şi nu se disociază în lanţurile sale peptidice constituente.

Întrucît această formă are o greutate moleculară foarte apropiată de greutatea moleculară a formelor stabile de NGF detectate în alte ţesuturi şi lichide biologice, M. Young şi colab. presupun că aceasta ar fi forma nativă de NGF (50).

PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE NGF

NGF este o proteină nedializabilă (1), (7), (9), (10), labilă la căldură, cu punctul izoelectric 9,3.

pH-ul optim pentru activitatea biologică este 5.

Spectrul de absorbție în ultraviolete la pH 5 este maxim la 280 nm.

Densitatea optică la o soluție de 1 ng/ml apă distilată la 280 nm este 1,03.

La pH neutru, subunitatea α are sarcină electrică negativă, β pozitivă și γ slab negativă.

Proteina este distrusă de acizi și proteaze și este stabilă în alcalii și uree.

Activitatea biologică este inhibată de iodoacetați, fluoruri, cianuri, dinitrofenol (1), (8), (9), (10).

Pentru manifestarea activității biologice este necesară prezența în mediu a unei surse de energie (glucoză, manoză) și a unui minim de aminoacizi esențiali (10).

În absența unei surse de energie, creșterea neuritelor este inițiată, dar se întrerupe brusc.

O proprietate interesantă a proteinei NGF este aceea de a fi adsorbită reversibil pe o varietate de suprafețe, independent de faptul că aceste suprafețe sînt polare sau nepolare (1), (24).

Proteina este puternic adsorbită pe sticlă, sticlă + silicon și polipropilenă și mai puțin adsorbită pe polistiren sau teflon.

PROPRIETĂȚILE BIOLOGICE

Semnificația fiziologică a NGF a fost pusă cel mai bine în evidență prin tratarea mamiferelor nou-născute cu anticorpi specifici și prin efectele morfologice și biochimice produse de NGF exogen *in vivo* și *in vitro*.

De altfel, efectele morfologice de creștere exagerată a fibrelor nervoase sub influența NGF au constituit atît baza pentru descoperirea și izolarea factorului, cît și baza testărilor biologice folosite pînă în prezent (1).

a. **Rolul NGF în supraviețuirea neuronilor receptivi** a fost foarte bine evidențiat prin administrarea de anticorpi anti-NGF de șoarece la mamiferele nou-născute, ceea ce a condus la distrugerea dramatică a ganglionilor simpatici pre- și paravertebrali, fenomen denumit imunosimpatectomie (1), (2), (9), (44).

Cu înaintarea în vîrstă, proporția de neuroni care se distrug ca urmare a administrării de anti-NGF scade, iar la adulți efectele sînt temporare și se limitează la diminuarea enzimelor tirozinhidroxilaza și β-tirozinhidroxilaza, implicate în sinteza norepinefrinei (neurotransmițător adrenergic) (51) și în reducerea temporară a pericarionilor simpatici (2), (3), (51).

Tratamentul cu ser anti-NGF produce și degenerarea celulelor cromafine de medulosuprarenală, dacă administrarea se face înainte de naștere (52), ceea ce înseamnă că, avînd aceeași origine cu celulele nervoase simpatice, celulele cromafine sînt dependente de NGF în stadii timpurii onto-

genetice. Dependența celulelor nervoase senzitive și simpatice de NGF, demonstrată și *in vitro*, scade cu vîrsta, la fel ca și *in vivo* (3), (51).

Nu există evidențierea dacă și *in vivo* neuronii senzitivi sînt dependenți de NGF pentru supraviețuire.

b. **Efectele generale de creștere produse de NGF.** Primele observații privind efectul biologic al NGF au fost creșterea în mărime a neuronilor mediodorsali senzitivi din ganglionii rădăcinilor dorsale (1), (2) de embrion de găină și, în raport cu aceasta, creșterea celulelor neneuronale satelit (1), (2), (3). Acest efect de creștere apare și la neuronii simpatici, la care însă influența se manifestă pe tot timpul vieții, dar diminuează cu vîrsta (1), (2), (3).

Această proprietate a NGF merge paralel cu capacitatea sa de a induce creșterea activității ornitindecarboxilazei (ODH) în ganglionii simpatici (3).

NGF poate fi considerat agent trofic neuronal care funcționează ca activator pleiotipic al unor variate căi anabolice și catabolice (4), printre alte efecte producînd creșterea încorporării de uridină marcată, creșterea sintezei proteice și de ARN (1), (2), (10), (43), (53), (54), (55), creșterea sintezei de lipide (11), creșterea utilizării glucozei pe cale direct oxidativă (1), (8), (30).

Sub influența NGF, în citoplasma neuronilor receptivi apare o supraproducție de microtubuli, microfilamente și neurofilamente, care se polimerizează în axonii prelungiți (1), (54).

În afară de aceste efecte, NGF inhibă biosinteza de mucopolizaharide în condrocite (4) și afectează adenilciclaza din granulele de cromafină ale celulelor medulosuprarenalei (4).

Cercetări recente (56) au pus în evidență rolul NGF în metabolismul substanței P, neurotransmițător din ganglionii senzitivi ai rădăcinilor dorsale, caracteristic pentru creșterea și dezvoltarea acestor ganglioni *in vivo*. Astfel, J. A. Kessler și I. B. Black (56) au arătat că tratamentul cu NGF induce creșterea atît a substanței P (SP) din ganglioni, cît și a proteinelor totale ganglionare.

Deci, ganglionii senzitivi rămîn receptivi la NGF și după perioada embrionară, fără a avea însă nevoie de acest factor pentru supraviețuire. Dar, spre deosebire de ganglionii simpatici, unde antiNGF distruge tirozinhidroxilaza și dopamin-β-hidroxilaza, enzime caracteristice neuronului simpatic matur, în cazul neuronului senzitiv antiNGF nu împiedică dezvoltarea SP.

c. **Rolul NGF în stimularea și menținerea diferențierii neuronilor receptivi.** Tratamentul cu NGF duce la transformarea morfologică a simpatoblastelor în neuroni diferențiați (2) la animalele nou-născute, cu dezvoltarea reticulului endoplasmic rugos, a aparatului Golgi, a neurofilamentelor (1), (2), (55), ceea ce determină accelerarea formării prelungirilor nervoase *in vivo* și *in vitro*.

Creșterea exagerată a fibrelor nervoase la neuronii receptivi poate fi asociată cu efectele generale de creștere produse de NGF, efecte care necesită sinteza de noi proteine. Rolul NGF în diferențiere este pus în evi-

denţă în special prin inducţia selectivă de tirozinhidroxilază şi β-tirozinhidroxilază în neuronii simpatici şi în celulele medulosuprarenale (51). Inducerea acestor enzime cheie în sinteza norepinefrinei în ganglionii simpatici este independentă de vîrstă, spre deosebire de inducerea ornitindecarboxilazei (3), (51).

Această inducere este paralelă cu creşterea activităţii fibrelor colinergice preganglionare, ultimul efect fiind iniţiat de acetilcolină pe calea receptorilor nicotinici (57). Ambele efecte sînt potenţate de glucocorticoizi, dar efectul NGF este reglat la nivel posttranscripţional, în timp ce inducerea transsinaptică are loc la nivel transcripţional (52).

d. **Efectul chemotactic al NGF** asupra celulelor sale receptive a fost demonstrat încă de la începutul cercetării acestui factor (1). Astfel, grefarea de fragmente de sarcom 180 sau sarcom 37 în membrana corioalantoidă a stimulat o invadare atipică cu fibre nervoase a vaselor de sînge, obstrucţionîndu-le. Acest efect chemotactic al NGF a fost demonstrat *in vivo* de către R. Levi Montalcini şi prin injecţii intracerebrale de NGF la animalele nou-născute (52). Fibrele nervoase simpatice, pornind de la ganglionii paravertebrali simpatici adiacenţi, s-au abătut din drumul lor către periferie şi au intrat prin rădăcinile senzitive ale nervilor spinali şi cefalici în măduva spinării şi în trunchiul cerebral, unde s-au menţinut ca sisteme parazite atît timp cît s-au alimentat cu NGF exogen (52).

e. **Rolul NGF ca mediator de informaţie trofică** între organele efectoare şi neuronii receptivi care le inervează a fost ilustrat de o serie de cercetări (51), (52). Astfel, NGF este captat cu înaltă specificitate de către terminaţiile nervilor simpatici şi senzitivi (51) şi este transportat retrograd prin veziculele şi cisternele membranale ale axonului la corpul celulei nervoase în reticulul endoplasmic şi în structurile lizozomale, de unde îşi exercită efectele sale biologice şi biochimice.

Funcţia de mediator retrograd de informaţie a NGF a fost pusă indirect în evidenţă întrerupînd conexiunea dintre corpul celulei nervoase şi organul efector periferic prin transsecţionarea fibrelor adrenergice postganglionare (axotomie), prin distrugerea chimică a terminaţiilor nervoase cu 6-hidroxidopamină sau prin blocarea transmiterii impulsului nervos postsinaptic cu substanţe toxice, ca vinblastină şi guanetidină (52). Aceste operaţii cauzează degenerarea ireversibilă a pericarionilor la animalele nounăscute sau reducerea temporară a funcţiilor celulei nervoase la animalele adulte (51). Toate aceste efecte pot fi prevenite prin administrarea locală, sistematică, de NGF, de unde şi rolul antitoxic protector al NGF (52). Neutralizarea NGF endogen prin injectarea de antiNGF mimează efectele întreruperii conexiunii axonale (51).

f. **Acţiunea NGF asupra unor celule neneuronale în cultură** (58), (59). NGF acţionează asupra celulelor PC_{12} de feocromocitom de medulosuprarenală, conferindu-le o serie de proprietăţi, asemănătoare neuronilor simpatici : emitere de prelungiri nervoase, excitabilitate electrică, chemosensibilitate la acetilcolină, dar, spre deosebire de neuronii simpatici, aceste celule nu necesită NGF pentru supravieţuirea lor în cultură.

g. **Activitatea enzimatică a NGF.** D. G. Attardi şi colab. (60), L.A. Greene şi colab. (41), S. E. Pattison şi M. F. Dunn (44), (61), A. M. J. Au

și M. F. Dunn (42) și M. Young (48) au pus în evidență că NGF posedă o activitate enzimatică proteolitică și că această proprietate se datorește subunității γ arginin-esteropeptidazică.

Izolat din glanda submaxilară de șoarece, NGF este inactiv enzimatic, dar, după o prealabilă diluare, el este supus la o activare autocatalitică și la o concomitentă generare de activitate puternic enzimatică, testată pe o serie de substrate sintetice, cum ar fi TAME (Nα-p-toluenesulfonyl-L arginine metyl ester), BAA (α-N-benzoyl-L-argininamide) sau BAPNA (α-N-benzoyl-D, L-arginine-p-nitroanilide).

Nu se cunoaște cîte situsuri active are proteina și nici dacă situsul autocatalitic este același cu cel ce hidrolizează substratele sintetice.

M. Young (48) arată că forma stabilă a NGF, HMW NGF, denumită și NGF zimogen, este o protează înalt specifică, care transformă plasminogenul în plasmină cu liza ulterioară a cheagului de fibrină.

Pînă în prezent, activarea plasminogenului este singura acțiune enzimatică cunoscută a HMW NGF pe un substrat de importanță fiziologică și de origine neneuronală (62).

MECANISMUL DE ACȚIUNE AL NGF

Prima etapă pentru toate acțiunile NGF asupra celulelor sale țintă o constituie interacțiunea sa cu receptorii specifici de membrană (55).

Receptorii NGF au fost caracterizați într-o serie de lucrări (63), (64); de curînd s-a demonstrat existența a două grupe: receptori de înaltă afinitate ($K_d = 2{,}3 \times 10^{-11}$M), care par a media creșterea fibrelor și supraviețuirea neuronilor, și receptori de afinitate scăzută ($K_d = 1{,}7 \times 10^{-9}$M), care mediază reglarea sintezei de norepinefrină.

Etapele care urmează legării NGF de receptorii de membrană sînt încă neclarificate.

Efectele produse de NGF nu au loc toate în același timp. Încorporarea metaboliților este relativ rapidă și are loc în primele ore de incubare, în timp ce proliferarea neuritelor are loc după 12—48 de ore. Efectul de supraviețuire este de asemenea de durată.

Se pare că NGF acționează printr-o complexitate de procese inițiate de legarea sa de receptorii specifici de membrană (4) și terminate în celulă prin combinarea cu receptorii nucleari. Totuși, G. P. Harper și H. Thoenen (3) susțin că nu există vreo dovadă că NGF ar intra intact în citoplasma neuronală sau în compartimentele nucleare, ceea ce sugerează că reglarea tirozinhidroxilazei și dopamin-β-hidroxilazei, ca și polimerizarea microfilamentelor și microtubulilor pentru creșterea exagerată a axonilor, ar putea avea loc prin intermediul unui mesager secundar, încă necunoscut.

ÎNCHEIERE

Studiul NGF a cuprins trei etape: descoperirea, caracterizarea și determinarea semnificației biologice. Ultimele două etape sînt încă în curs de cercetare.

Probabil că există și alți factori de creștere neuronali care acționează asupra altor segmente ale sistemului nervos în diferite etape ale dezvoltării organismelor. De altfel, D. Edgar (30) a evidențiat faptul că și alți factori, cum ar fi cei din culturile derivate din inimă sau alte țesuturi, pot stimula creșterea fibrelor nervoase și pot produce supraviețuirea neuronilor din ganglionii senzitivi explantați, acești factori existînd și *in vivo*. Mai mult, spre deosebire de NGF, ei au efect și asupra ganglionilor parasimpatici, dar anticorpii lor nu produc efectele dramatice date de antiNGF.

Studierea în continuare a efectelor antiNGF va clarifica, desigur, tot mai mult rolul fiziologic al acestei proteine atît de interesante.

Prezentat la redacție
la 8 iunie 1981

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

BIBLIOGRAFIE

1. R. LEVI MONTALCINI, P. U. ANGELETTI, Phys. Rev., **48**, 534 (1968).
2. W. C. MOBLEY, A. C. SERVER, D. N. ISHII, R. J. RIOPELLE, E. M. SHOOTER, New Engl. J. Med., **297**, 1096, 1149, 1211 (1977).
3. G. P. HARPER, H. THOENEN, J. Neurochem., **34**, 5 (1980).
4. R. A. BRADSHAW, Ann. Rev. Biochem., **47**, 191 (1978).
5. E. D. BUEKER, Anat. Record., **102**, 369 (1948).
6. V. HAMBURGER, R. LEVI MONTALCINI, J. Exp. Zool., **111**, 457 (1949).
7. S. COHEN, R. LEVI MONTALCINI, V. HAMBURGER, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., **40**, 1014 (1960).
8. S. COHEN, R. LEVI MONTALCINI, Cancer Res., **17**, 15 (1957).
9. R. LEVI MONTALCINI, Science, **143**, 105 (1964).
10. S. COHEN, J. Biol. Chem., **234**, 1129 (1959).
11. G. P. HARPER, Y. A. BARDE, G. BURNSTOCK, J. R. CARSTAIRS, M. E. DENNISON, K. SUDA, C. A. VERNON, Nature, **279**, 160 (1979).
12. L. D. GOLDSTEIN, C. P. REYNOLDS, J. R. PEREZ-POLO, Neurochem. Res., **3**, 175 (1978).
13. P. WALKER, M. E. WEICHSEL, D. A. FISHER, Life Sci., **26**, *3*, 195 (1980).
14. J. R. PEREZ-POLO, C. E. BECK, M. BLUM, *Perspectives in Schizophrenia Research*, sub red. C. BAXTER, I. MELNECHUK, Raven Press, New York, 1980.
15. J. R. PEREZ-POLO, P. DY, K. WESTLUND, K. HALL, K. LIVINGSTON, Birth Defects, **14**, 311 (1978).
16. R. A. MURPHY, J. D. SAIDE, M. H. BLANCHARD, M. YOUNG, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **74**, 2672 (1977).
17. R. A. MURPHY, J. D. SAIDE, M. H. BLANCHARD, M. YOUNG, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **74**, 2330 (1977).
18. J. R. PEREZ-POLO, M. BOMAR, C. BECK, K. HALL, J. Biol. Chem., **253**, 6140 (1978).
19. R. LEVI MONTALCINI, Harvey Lect., **60**, 217 (1965).
20. L. J. WALLACE, L. M. PARTLOW, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **73**, 4210 (1976).
21. B. E. C. BANKS, Nature, **246**, 503 (1973).
22. F. L. PEARCE, B. E. C. BANKS, D. V. BANTHORPE, A. R. BERRY, H. S. DAVIES, C. A. VERNON, Europ. J. Biochem., **29**, 417 (1972).
23. S. FURUKAWA, K. HAYASHI, J. Biochem., **80**, 1001 (1976).
24. F. L. PEARCE, D. V. BANTHORPE, J. M. COOK, C. A. VERNON, Europ. J. Biochem., **32**, 569 (1973).
25. G. P. HARPER, H. THOENEN, J. Neurochem., **34**, 5 (1980).
26. K. SUDA, Y. A. BARDE, H. THOENEN, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., **75**, 4042 (1978).
27. A. M. LONGO, E. F. PENHOET, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 2347 (1974).
28. J. OGER, B. G. W. ARNASON, N. PANTAZIS, J. LEHRICH, M. YOUNG, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **71**, 1554 (1974).
29. M. YOUNG et al., Science, **187**, 361 (1975).
30. D. EDGAR, în *Trends in Neurosciences*, Elsevier, North Holland, 1979, p. 316.

31. S. VARON, A. P. SMITH, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **7**, 3259 (1968).
32. H. ANUNDI, L. RASK, P. A. PETERSON, Zoon, **6**, 213 (1978).
33. S. VARON, J. NOMURA, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **7**, 1296 (1968).
34. R. H. ANGELETTI, R. A. BRADSHAW, R. D. WADE, Biochemistry, **10**, 463 (1971).
35. R. W. STACH, P. F. PIGNATI, M. E. BAKER, E. M. SHOOTER, J. Neurochem., **34**, 850 (1980).
36. R. W. STACH, A. C. SERVER, P. F. PIGNATI, A. PILTCH, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **15**, 1955 (1976).
37. R. H. ANGELETTI, D. MERCANTI, R. A. BRADSHAW, Biochemistry, **12**, 90 (1973).
38. R. H. ANGELETTI, M. A. HERMODSON, R. A. BRADSHAW, Biochemistry, **12**, 100 (1973).
39. J. B. MOORE, W. C. MOBLEY, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **13**, 833 (1974).
40. E. A. BERGER, E. M. SHOOTER, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **74**, 3647 (1977).
41. L. A. GREENE, E. M. SHOOTER, S. VARON, Biochemistry, **8**, 3735 (1969).
42. A. M. J. AU, M. F. DUNN, Biochemistry, **16**, 3958 (1977).
43. W. A. FRAZIER, R. H. ANGELETTI, R. A. BRADSHAW, Science, **176**, 482 (1972).
44. S. E. PATTISON, M. F. DUNN, Biochemistry, **15**, 3691 (1976).
45. R. BLUNDELL, G. DODSON, D. HODGKIN, D. MERCOLA, Advanc. Protein Chem., **26**, 279 (1972).
46. R. H. ANGELETTI, W. A. FRAZIER, J.W. JACOBS, M. D. HIALL, R. A. BRADSHAW, Biochemistry, **15**, 26 (1976).
47. W. C. MOBLEY, A. SCHENKER, E. M. SHOOTER, Biochemistry, **15**, 5543 (1976).
48. M. YOUNG, Biochemistry, **18**, 3050 (1979).
49. E. ZAIMIS, L. BERK, B. A. CALLINGHAM, Nature, **206**, 1220 (1965).
50. M. YOUNG, J. D. SAIDE, R. A. MURPHY, M. H. BLANCHARD, Biochemistry, **17**, 1490 (1978).
51. H. THOENEN, M. SCHWAB, U. OTTEN, *Molecular Control of Proliferation and Differentiation*, 35th Symp. of the Soc. for Develop. Biol., Asilomar (California), 1976, Pergamon Press, New York, 1978.
52. R. LEVI MONTALCINI, Bull. Mém. Acad. roy. Méd. Belgique, **134**, 217 (1979).
53. P. U. ANGELETTI, D. G. ATTARDI, G. TOSCHI, M. L. SALVI, R. LEVI MONTALCINI, Biochem. Biophys. Acta, **95**, 111 (1965).
54. D. B. HIER, B. G. W. ARNASON, M. YOUNG, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **69**, 2268 (1972).
55. W. A. FRAZIER, C. G. OTHLENDORF, L. F. BOYD, L. ALOE, E. M. JOHNSON, J. A. FERRENDELLI, R. A. BRADSHAW, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 2448 (1973)
56. J. A. KESSLER, I. B. BLACK, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **77**, 649 (1980).
57. D. A. KHARKEWICH, *Pharmacology of Ganglionic Transmition*, în *Handbook of experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1980, vol. 53.
58. L. A. GREENE, J. Cell Biol., **78**, 747 (1978).
59. J. L. CONNOLLY, L. A. GREENE, R. R. VISCARELLO, W. D. RILLEY, J. Cell Biol. **82**, 820 (1979).
60. D. G. ATTARDI, M. J. SCHLESINGER, S. SCHLESINGER, Science, **156**, 1253 (1967).
61. S. E. PATTISON, M. F. DUNN, Biochemistry, **14**, 2733 (1975).
62. N. S. ORENSTEIN, H. F. DVORAK, M. H. BLANCHARD, M. YOUNG, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **75**, 5497 (1978).
63. A. SUTTER, R. J. RIOPELLE, R. M. NARRIS-WARRICK, E. M. SHOOTER, J. Biol. Chem., **254**, 5972 (1979).
64. K. HERRUP, E. M. SHOOTER, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **70**, 3884 (1973).

RECENZII

G. MAYER şi K.-H. HAASE *Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik* Band 26; *Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression. Biomechanische Modellversuche und tierexperimentelle Untersuchunger (Progrese ale biofizicii experimentale şi teoretice*, volumul 26 : *Stabilitatea osteosintezelor cu fixarea externă şi compresie. Experimente biomecanice pe modele şi cercetări experimentale pe animale*), VEB Georg Thieme—Verlag, Leipzig, 1981, 112 pagini cu 40 de figuri şi 33 tabele

Acest volum, bazat pe o practică îndelungată a autorilor în domeniul modern al ortopediei şi traumatologiei scheletice, vine să completeze un gol de mult resimţit în literatura medicală de specialitate. Autorii tratează cu competenţă şi la un înalt nivel ştiinţific procesele de vindecare a fracturilor osoase prin fixare exterioară, ţinînd seama de cele mai recente rezultate ale cercetărilor asupra biomecanicii fixării compresive a fragmentelor osoase. Materialul este expus concis, clar şi este însoţit de o serie de tabele, grafice, scheme, fotografii şi radiografii, care ajută mult la o înţelegere mai bună a celor prezentate.

După o scurtă introducere, autorii tratează pe rînd bazele mecanice ale stabilităţii osului, celulele electrice cu semiconductori de măsurare a forţelor de compresare, măsurarea forţei de compresare interfragmentară, relaţiile dintre mărimea forţei de compresare şi rezistenţa la îndoire a sistemelor de montaj în cadrul osteosintezelor externe, stabilitatea la solicitări de torsiune a osteosintezelor şi rezultatele experimentale obţinute pe tibii de oaie osteotomizate. Urmează un capitol dedicat discuţiilor. Un scurt rezumat şi un index de literatură cu 115 trimiteri bibliografice, care ia în consideraţie lucrări de specialitate apărute pînă în 1979, încheie această monografie, utilă atît din punct de vedere teoretic, cît şi practic.

Horst D. Schell

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenetic Risk of Chemicals to Humans, vol. 23 : *Some Metals and metallic Compounds (Cîteva metale şi compuşi metalici)*, editat de World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, iulie 1980, 438 pagini

Volumul reprezintă opiniile experţilor din cadrul grupului de lucru IARC asupra riscului carcinogenic al unor chimicale pentru oameni.

Obiectivul programului este de a elabora şi publica date despre grupe de chimicale cu efect cancerigen asupra omului. Analiza critică a acestor date este realizată de autorităţi internaţionale, fiind recomandate şi măsuri preventive.

În volumul de faţă sînt prezentate riscurile carcinogenice ale arsenului, beriliului, cromului, plumbului, precum şi ale compuşilor lor. În mod excepţional au fost incluse date chimice pentru o serie de compuşi pentru care nu se cunoşteau date biologice, de exemplu tetraoxidul de plumb, cel mai important compus din această categorie.

Metodele specificate pot fi eliminate în mod natural sau prin procedee speciale ; ele pot reapărea după un timp în biosferă în forme biologice importante.

Expunerile timp îndelungat la agenţi de joasă toxicitate prezintă un risc cancerigen mai pronunţat decît o expunere de scurtă durată, dar la agenţi cu grad pronunţat de periclitate.

Transformările compuşilor metalici care au loc în organism duc la producerea de noi substanţe care au un mare potenţial carcinogen.

Teste pentru detectarea potențialului carcinogen, a mutagenicității la bacterii au fost realizate pentru compușii cromului hexavalent, precum și pentru ceilalți compuși considerați în acest volum.

Sărurile de arsen, beriliu, plumb și crom trivalent în doze foarte mari produc aberații cromozomale și transformări morfologice în culturi de celule ale mamiferelor.

Lucrarea prezintă și situația administrării în paralel a două metale sub forma unor compuși unici. În această situație se încearcă separarea efectelor toxice individuale ale celor două elemente de efectele cooperative și de cel carcinogenic rezultat.

În multe situații, efectele sînt studiate în funcție de treapta de valență a elementului, observîndu-se cu atenție distribuția lor la nivelul diferitelor organe, țesuturi și chiar intracelular la nivelul unor organite (de exemplu mitocondriile).

Eugenia Pandele

Statistical Methods in Cancer Research vol. I : *The Analysis of Case-control Studies (Metode statistice în cercetarea cancerului)*, sub red. N. E. BRESLOW, N. E. DAY, Technical editor for IARC W. DAVIS, editat de World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1980, IARC Scientific Publications No. 32, 338 p.

Această monografie își propune să pună la îndemînă celor care lucrează în epidemiologie o metodă de lucru de o foarte bună valoare statistică. Trebuie totuși remarcat că în această privință se impun unele rezerve derivate din faptul că datele obținute provin dintr-un domeniu care are o dublă natură nedeterminată.

Astfel spus, este vorba de „epidemiologia cancerului", adică datele se referă la o maladie despre a cărei propagare se știu relativ puține lucruri, termenii de contagiune și epidemie trebuind luați în acest caz cu prudență.

În deplină concordanță cu această situație, materialul este structurat după cum urmează : 1. O prezentare a studiului cancerului din punctul de vedere al epidemiologiei. 2. Obiectivele care trebuie realizate prin acest studiu statistic. 3. Aprecieri asupra capacității metodei (ca act general de cunoaștere). 4. Limitele și rezervele procedeului. 5. Interpretarea datelor statistice cu discutarea amănunțită a semnificațiilor curente și particulare ale rezultatelor.

Pentru atingerea acestor mobiluri se folosește un tratament matematic adecvat, tehnica de calcul nefiind totuși deosebit de complicată.

Lucrarea este abundent ilustrată cu grafice, nomograme, tabele etc., ceea ce face folosirea ei operantă. Este, fără îndoială, un model de aplicație practică a statisticii în domeniul fenomenelor biologice, motiv pentru care lucrarea constituie un prețios îndrumător pentru mulți dintre cei mai puțin inițiați în ale statisticii, dar care au nevoie de ea.

Eugenia Pandele

ENNIO PANNESE, *The Satellite Cells of the Sensory Ganglia (Celulele satelit ale ganglionilor senzitivi)*, în *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* vol. 65, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 111 pagini, 30 figuri

Această lucrare reprezintă prima monografie despre celulele satelit (celule care învelesc pericarionul și segmentul inițial axonal la neuronii senzitivi) de la descoperirea lor de către A. Valentin în 1836.

Cele 22 de capitole ale volumului conțin cercetări proprii ale autorului, precum și date morfologice, citochimice și experimentale dintr-un număr mare de lucrări, cu evaluări critice ale autorului.

Sînt analizate diverse aspecte ale celulelor satelit, ca forma și structura (cap. 3 și 4), interrelațiile (cap. 5), relațiile lor cu pericarionul și cu țesuturile de legătură (cap. 6, 7, 8, 9), originea și dezvoltarea (cap. 10), chimia și citochimia (cap. 11), proprietățile biologice (cap. 12, 13, 14), reacțiile la condițiile experimentale și patologice (cap. 16, 17), rolul, similitudinile și diferențele în raport cu alte celule nevroglice ale sistemului nervos central și periferic (cap. 18, 19, 20).

Autorul accentuează de asemenea și domeniile unde este încă necesară o aprofundare a cercetării celulelor satelit (cap. 21), pentru ca în capitolul final să facă un succint rezumat al întregii lucrări.

Elisabeta Mihăilescu

Biological Effects of mineral Fibres (Efectele biologice ale fibrelor minerale), vol. I și II, Proceedings of a Symposium organized by IARC, l'Institut National de la Santé et de la Recherche médicale France and the Medical Research Council, U.K., held at the International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 25—27 September 1979, sub red. J. C. WAGNER, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1980 (IARC Scientific Publications No. 30), distributed for the World Health Organization, 495 p. + 1001 p.

Acest simpozion a avut loc ca o continuare a întîlnirii din 1972, la care s-au discutat efectele biologice ale fibrelor minerale.

La acea întîlnire s-a arătat că mărimea fibrelor este de mare importanță pentru apariția bolilor ca urmare a inhalării nu numai a pulberilor de azbest, ci și a altor pulberi minerale cu proprietăți fizice asemănătoare.

Lucrarea cuprinde o foarte interesantă secțiune asupra epidemiologiei bolilor legate etiologic de prezența compușilor de tipul azbestului. Este vorba, de fapt, de tratarea cu mijloace epidemiologice a unor boli care numai în mod secundar sînt infecțioase, și nu întotdeauna. De fapt, cea mai grea problemă (și aceasta justifică pe deplin interesul Agenției internaționale pentru studierea cancerului) este aceea a tumorilor maligne consecutive expunerilor prelungite la pulberi de silicați fibroși. În această ordine de idei, de mare interes sînt capitolele privitoare la distribuția particulelor de fibre minerale în tumori, care aduc dovezi histologice asupra importanței particulelor în apariția și evoluția ulterioară a acestor cancere.

Deosebit de interesantă este, de asemenea, și secțiunea referitoare la proprietățile fizice și chimice ale mineralelor fibroase de tipul azbestului. Capitolele acestei secțiuni tind să explice efectele fiziologice care stau la baza carcinogenezei.

În principal adresîndu-se toxicologilor și oncologilor, lucrarea interesează în mare măsură și pe biochimiști, biologi și mineralogi.

Eugenia Pandele

Handbook of sensory Physiologi vol. VII/6B : *Vision in Invertebrates*, B : *Invertebrate visuat Centers and Behavior I (Manual de fiziologie senzorială.* vol. VII/6B : *Vederea la nevertebrate*, B : *Centrii vizuali la nevertebrate și comportamentul I*), sub red. HANSJOCHEM AUTRUM, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 629 pagini, 319 figuri

Această nouă apariție în frumoasa serie editorială a manualelor de fiziologie senzorială este în realitate un tratat bazat pe o sinteză vastă a celor mai importante lucrări privind neuroarhitectura regiunilor din creier care deservesc ochii compuși ai crustaceelor și insectelor, principiile neurale ale sistemului vizual, *simțul polarizării*, optica și vizualitatea la nevertebrate.

Este de remarcat unitatea realizată de autori între datele de structură externă, anatomie și citologie a ochilor, relațiile ochilor cu centrii vizuali din creier și datele prelucrate la nivel biofizic și matematic asupra capacității vizuale a nevertebratelor. Sînt prezentate rezultatele sintetice a numeroase cercetări privind căile reflexe de reglare și transmitere a impulsului nervos și de formare a imaginilor și se propun modele dinamice pentru aceste activități.

Sînt studiate concret, prin impregnații argentice, schematic și în diagrame, relațiile sinaptice dintre ocelii ochiului complex. Aceste cercetări merg în profunzime pînă la stadiul ultrastructural al sinapselor interocelare și ajung la conexiunile dintre cei doi ochi complecși, care se realizează sub forma unor trasee nervoase prin deutocerebrum.

Cercetările morfologice sînt completate de studii de neurofiziologie privind identitatea și complementaritatea fotoreceptorilor ocelari și neuronilor și mecanismelor care generează răspunsul neuronilor ocelari la ocelii de lăcustă, precum și reconstituirea imaginilor, inhibiția și adaptarea la lumină a ochilor de *Limulus*.

Se descrie recepția diferitelor intensități luminoase, de la semnalul fotonic unic pînă la bruiajul fotoreceptorilor ca fenomen natural în percepția vizuală cu ochi complecși, și se anali-

zează calitatea imaginii neuronale, trecînd prin probleme legate de rezoluția spațială, interacțiunile dintre fotoreceptori, potențialele intra- și extracelulare în lumina și implicațiile proceselor periferice la semnalele contrastante.

Capitolul final, intitulat „Optica și vizualitatea la nevertebrate", se referă la limitele optice ale vederii și la sensibilitatea absolută, la rezoluția receptorilor vizuali, trecînd prin aberațiile sferice, cromatice și capacitățile de acomodare, și se termină cu o analiză complexă, morfo-ecologică, a vizibilității cu ochi simpli sau compuși cu imagine laterală sau suprapusă la nevertebrate acvatice și terestre.

Deși cartea este formată din patru capitole cu autori diferiți, ceea ce duce la o anumită suprapunere a unor elemente fundamentale privind structura și fiziologia ochilor, nivelul de expunere și de înțelegere a fenomenelor vizuale în lumea atît de variată a nevertebratelor este remarcabil.

Această carte este necesară cadrelor didactice și cercetătorilor specializați în morfologia și fiziologia vederii, precum și cercetătorilor specializați în bionică.

Paula Prunescu

Myocardial Biopsy. Diagnostic Significance (Biopsia de miocard Semnificație diagnostică), sub red. H.-D. BOLTE, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, 146 pagini, 60 figuri, 60 tabele

Cartea, care conține lucrările unei conferințe organizate de Societatea internațională și de Federația de cardiologie în iulie 1978, cuprinde trei secțiuni : morfologie, morfometrie și imunologie, biochimie.

Inițial se descriu tehnica de biopsie endomiocardică și căile de acces în interiorul inimii : în ventriculul drept prin vena antecubitală sau prin vena femurală, iar în ventriculul stîng prin arteriotomie brahială sau prin artera femurală. În alte lucrări se realizează o analiză morfologică a biopsiilor miocardice corelate cu diferite tipuri de boli de inimă și o evaluare morfologică (histologică, histochimică și ultrastructurală) a biopsiilor endomiocardice. În continuare se prezintă aspecte hsitologice și ultrastructurale în anumite cardiopatii : în boala Fabry, în cardiopatii primare, în hipertrofii ventriculare congenitale sau cîștigate etc.

Capitolul de morfometrie și imunologie cuprinde lucrări de morfometrie a celulelor miocardice în condițiile unor fibroze interstițiale, hipertrofie celulară striată și netedă a endocardului, miocardită etc. În alte lucrări se descrie decelarea prin tehnici de imunofluorescență a depozitelor tisulare de IgG, IgM, IgA, fibrinogen, în diferite afecțiuni cardiace.

Capitolul de biochimie cuprinde lucrări referitoare la numeroase activități enzimatice în probe biopsice de miocard, prezența virusurilor Coxsackie în omogenate de miocard sau în fluid pericardial în unele boli cardiace acute sau cronice, schimbări ale poliribozomilor miocardici în cardiopatia cu adriamicină etc.

Cartea, care se încheie cu un index de subiecte, este deosebit de utilă pentru laboratoarele clinice din secții de cardiologie și chirurgie cardiacă, precum și pentru cercetătorii interesați în structura normală și în biopatologia leziunilor cardiace.

C. C. Prunescu

ALF BRODAL și KOKI KAWAMURA, *Olivocerebellar Projection : A Review (Proiecția olivocerebelară : O trecere în revistă)*, în *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol. 64, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg - New York, 1980, 140 pagini, 45 figuri

Trecerea în revistă a proiecțiilor olivocerebelare reprezintă o remarcabilă aducere la zi și punere în acord a datelor cuprinse în cîteva sute de lucrări, majoritatea din ultimele două decenii.

În carte se descriu anatomia și corelațiile neurofiziologice ale cerebelului la mamifere, trecîndu-se în revistă lobul anterior, lobul paramedian, vermisul lobului posterior cu lobulii VI—VIII, lobulul IX și uvula, lobulul ansiform, paraflocculul, lobul floculonodular și nucleii cerebelari.

Se descriu de asemenea oliva inferioară cu oliva medială accesorie, oliva dorsală accesorie, oliva principală și proiecțiile cerebeloolivare. Ultimul capitol, intitulat „Principiile generale ale organizării proiecțiilor olivocerebelare și unele corelații funcționale", prezintă o analiză a proiecțiilor olivare în diferiți lobi și lobuli cerebelari și în nucleii cerebelari. Aceste proiecții

sînt legate prin mecanisme feed-back, care modulează reciproc controlul cerebelar asupra olivei și influența acesteia asupra cerebelului.

Cartea, care se încheie cu un bogat capitol de bibliografie (12 pagini) și un index pe subiecte, este utilă neuromorfologilor și neurofiziologilor din clinică și din cercetare.

C. C. Prunescu

Electron Microscopy at molecular Dimensions (Microscopia electronică la dimensiuni moleculare), sub red. W. BAUMEISTER și W. VOGELL, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, 355 pagini, 181 figuri

Această carte reprezintă o culegere de lucrări prezentate la simpozionul de la Burg Gemen, Münsterland (R. F. Germania), în iunie 1979.

Unul din domeniile care s-au bucurat de un deosebit interes științific, fapt ilustrat și de numărul mare de comunicări, a fost legat de structura moleculară a pereților și a membranelor celulei bacteriene. Astfel, s-au prezentat aranjarea periodică a proteinei din porii membranei externe de la *Escherichia coli*, structura în monostrat a proteinelor hexagonale care constituie pătura externă a peretelui bacteriei *Micrococcus radiodurans*, bacterie rezistentă la radiații, și numeroase lucrări similare.

Cîteva lucrări se ocupă cu studiul structurii în spațiu a cristalelor de citocromoxidază și citocrom c-reductază. În lucrările din acest grup, se prelucrează grafic, pînă la realizarea unor modele în spațiu, datele obținute prin studiul fotografiilor de microscopie electronică prin transmisie asupra unor fragmente de membrane, proaspete sau fixate și colorate negativ, a difracțiilor optice sau cu raze X și eventual a preparatelor obținute prin tehnici de înghețare-rupere. Sînt remarcabile acuratețea cercetării și rigoarea rezultatelor într-un domeniu de vîrf în condițiile folosirii unor tehnici foarte familiare biologilor și biofizicienilor.

Numeroase lucrări analizează și propun noi tehnici de microscopie electronică scanning-transmisie, retransmisia imaginilor obținute prin transmisie cu dozaj scăzut de electroni prin tehnici T. V., evaluarea emulsiilor fotografice prin imagini de joasă expunere, proprietățile emulsiilor comerciale pentru microscopie electronică.

Un alt grup de lucrări se referă la folosirea microscopiei electronice de transmisie la temperaturile joase obținute cu helium lichid și totodată la folosirea temperaturilor foarte joase în difracția cu electroni.

Ultimul grup de lucrări se referă la asamblarea artificială a două straturi moleculare, prin procese de cristalizare a moleculelor biologice, autoasamblarea și nuclearea unui strat bidimensional cu subunități proteice sau asamblarea proteinelor cu un monostrat lipidic, în această ultimă lucrare proteina folosită fiind feritina.

Cartea, care se încheie cu un index al subiectelor, este utilă biofizicienilor și specialiștilor în biologia moleculară.

C. C. Prunescu

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenetic Risk of Chemicals to Humans, vol. 24: *Some pharmaceutical Drugs (Unele produse farmaceutice)*, editat de World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, September 1980, 337 pagini

Acest volum tratează un număr de diverse produse farmaceutice, printre altele fenacetina, fenoxibenzamina și reserpina, despre care s-a mai vorbit și în volume anterioare ale publicației de față.

Multe produse farmaceutice conțin grupe amino, care în principiu pot fi transformate în compuși nitroso prin reacții *in vitro* cu nitriți în condiții similare cu cele din stomacul uman. Se pare că acești compuși au un efect carcinogen asupra organismului uman, la fel ca pesticidele sau alte chimicale.

În volumul de față sînt date teste pentru limite de impurități ale medicamentelor sau alte, produse farmaceutice.

În evaluarea relației medicament-cancer pot fi luate în considerație o serie de puncte, printre care efectele secundare ale medicamentului.

Majoritatea medicamentelor considerate sînt folosite în mod curent, cum ar fi fenacetin, fenazopiridină, fenoxibenzamină, reserpină și altele.

Aceste evaluări pot fi importante pentru studii epidemiologice.

Eugenia Pandele

Freeze-Etching. Methods and Applications in Membrane Research (Corodare prin înghețare. Metode și aplicații în cercetarea membranei), sub red. HELMUT WALTER MEYER, în Acta histochemica, Supplement, Band 23, 1981, 294 pagini

Volumul, care tratează probleme teoretice și experimentale privind înțelegerea structurii membranei pe baza rezultatelor metodei de corodare prin înghețare, însumează, de fapt, lucrările Simpozionului internațional de corodare prin înghețare din 23—27 iulie 1979, ținut în Kapellendorf Castle și organizat de Friedrich Schiller University, Jena (R. D. Germană).

Tehnica corodării prin înghețare a devenit un instrument important pentru prepararea specimenelor destinate vizionării la microscopul electronic în transmisie. Această tehnică permite vizualizarea fracturii unui specimen, care, după ce a fost înghețat, a fost rupt. Fracturarea se face după elementele de interes, evidențiindu-le astfel.

Volumul oferă un tablou al progreselor realizate în folosirea și în interpretarea tehnicii de corodare prin înghețare. Informațiile foarte variate, prezentate, pot fi folosite de către cercetători ce nu utilizează direct această metodă.

Volumul are două mari capitole. În primul capitol, „Probleme de metodică", se tratează aspecte cu caracter general ale tehnicii de corodare-înghețare, cum ar fi stabilizarea specimenelor prin înghețarea tuturor componentelor lichide, faza de tranziție lichid-solid de interes major pentru specimenele biologice, efectul crioprotectorilor în faza de tranziție, considerațiuni asupra datelor teoretice și experimentale privind procesul de răcire, interpretarea datelor morfologice obținute prin fracturarea specimenului înghețat la temperaturi foarte joase, modul în care vaporii de apă se depun pe suprafețele fracturate, fenomene de contaminare, corodare-înghețare la celulele fixate și nefixate.

Într-un subcapitol de importanță vitală, se face o analiză cantitativă a imaginilor obținute prin metoda corodare-înghețare, în care se prezintă modul de reconstituire tridimensională a componentelor imaginii, folosind un aparataj matematic adecvat.

Tot în acest prim capitol se dau datele unui aparataj perfecționat, versatil, cuprinzînd criotom, microtom cu posibilitatea de a fi introdus în cameră vidată, tun pentru bombardament electronic, manipulatoare, dispozitiv de rotire a specimenului pentru metalizarea replicii etc.

Capitolul al doilea, „Aplicații în cercetarea membranei", se ocupă, printre altele, cu studii asupra naturii particulelor intramembranoase, studii asupra particulelor lipidice, studii pe membrane de eritrocite, pe lizozomi izolați, precum și studii asupra structurii suprafeței unor virusuri și asupra ultrastructurii unor bacterii anaerobe.

Volumul este bogat în informații la obiect, ilustrat cu imagini de foarte bună calitate, iar fiecare subcapitol este urmat de o bibliografie completă, majoritatea titlurilor fiind de dată foarte recentă (1975—1979).

Corneliu Dimitriu

Advances in physiological Sciences, vol. 19 : *Gravitational Physiology (Fiziologie gravitațională)*, sub red. HIDEG & O. GAZENKO, Pergamon Press — Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1981, 315 pagini

Formată sub sarcina permanentă a gravitației, fiziologia organismelor terestre prezintă, în momentul de față, un anumit tablou cu al cărui aspect sîntem deja obișnuiți. Cum ar fi stat lucrurile dacă gravitația ar fi fost de la început absentă, aceasta este o chestiune practic fără soluție. Cum s-ar prezenta situația dacă un sistem biologic format în condițiile gravitației ar evolua la un moment dat în absența ei? Iată, în sfîrșit, o întrebare la care în ultimul timp se poate răspunde. Acest lucru a devenit posibil datorită activității cosmice a mai multor state, printre care și U. R. S. S.

Acest volum înmănunchează lucrări al căror scop este stabilirea fiziologiei diferitelor organisme în condițiile lipsei sau accentuării, simulate sau reale, a gravitației. Este vorba de

experimentele realizate pe om și pe diferite animale care au trăit un timp în stare de imponderabilitate. Problemele considerate fiind foarte diverse, gruparea lor pe capitole nu a fost foarte ușoară; totuși, aceste capitole au un aspect unitar și de aceea au o anumită autonomie.

Primul capitol, „Probleme generale. Adaptarea la schimbarea gravitației", începe cu remarci asupra stadiului actual al cunoștințelor noastre în acest domeniu și continuă cu prezentarea adaptării mamiferelor la imponderabilitate în sateliți, rezistența și reactivitatea animalelor în decursul readaptării la cîmpul gravific, gravitația artificială ca mijloc de contracarare a imponderabilității, bioritmuri în sateliți, ritmul excreției electroliților și hidroxiprolinei și evaluarea calitativă și cantitativă a structurilor citoplasmatice ale mușchiului cardiac de șobolan în satelitul cosmos-936.

Capitolul „Sisteme fiziologice. Studii metabolice și morfologice" prezintă unele aspecte mai caracteristice ale fiziologiei zborului cosmic, cum ar fi efectul zborului cosmic asupra compoziției corporale, aspectele metabolice ale stressului în zborurile spațiale, efecte morfologice induse de imponderabilitate la șobolanii care au zburat în sateliți, studii ale enzimelor hepatice specifice implicate în conversia zaharurilor în lipide, caracteristici neurochimice ale șobolanilor expuși îndelung la imponderabilitate, efectele zborului spațial asupra activării limfocitare la om.

Capitolul următor, „Funcția și structura sistemelor dependente de gravitație: sistemul vestibular, oasele și mușchii", prezintă fiziologia sistemelor orientării și locomoției în situațiile „cosmice".

Unele probleme tratate sînt deosebit de importante pentru practica zborurilor sub raportul securității cosmonauților, cum ar fi proprietățile contractile și compoziția proteinelor miofibrilare ale mușchilor striați în funcție de expunerea la condițiile cosmice de zbor, resorbția oaselor și absorbția calciului în timpul zborului cosmic.

Capitolul „Hipokinezia și imobilizarea" prezintă aspectele cele mai importante ale claustrării cosmice, cu o revenire specială la fiziologia mușchilor și a oaselor. Următoarele capitole, „Varia-I" și „Varia-II", tratează probleme mai puțin unitare, dar interesante și utile.

Volumul, deosebit de bine prezentat grafic, constituie o lectură foarte atractivă, fiind un excelent mijloc de informare.

Mihai Zamfir

Advances in physiological Sciences, vol. 26: *Homeostasis in Injury and Shock (Homeostazia în boli și șoc)*, sub red. S. BIRÓ, A. G. B. KOVÁCH, J. J. SPITZER și H. B. STONER, Pergamon Press—Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1981, 293 pagini

Acest volum, care prezintă lucrările Simpozionului satelit al celui de-al 28-lea Congres internațional de științe fiziologice, ce a avut loc la Budapesta în 1980, cuprinde două secțiuni: Comunicări ale unor invitați și Comunicările poster. Acestea din urmă sînt evident cu mult mai numeroase.

Comunicările invitaților speciali sînt grupate, după criterii tematice, în grupe de două pînă la patru, care se încheie cu discuții. Există șase asemenea grupe tematice, referitoare la creier și starea de șoc, metabolismul visceral și circulația în stări infecțioase și patogene, reflexele cardio-vasculare după îmbolnăvire, catecolaminele plasmatice în stare de emergență, sensibilitatea insulinică alterată în șocul endotoxinic și septic, fiziologia RES în șocul endotoxinic.

Comunicările poster prezintă o mare varietate de aspecte ale fenomenelor de șoc și înrudite. Astfel, protecția structurii miocardului în șocul hemoragic și morfologia pulmonară în șoc sînt unele dintre cele mai interesante din punctul de vedere al practicii atît de actuale a anesteziei și reanimării. Problemele sînt tratate cu multă minuțiozitate, chestiunile fiziologice fiind în permanență proiectate pe un serios fond biochimic, așa cum se poate observa din lucrarea „Catecolaminele, AMP ciclic și substratele metabolice după anafilaxie la șobolan" (lucrarea nu este unică în acest sens). Sînt investigate cu multă insistență componentele umorale susceptibile de a juca un rol în situațiile de șoc, cum ar fi unii hormoni: ACTH, STH, TSH, prolactina, tiroxina, triiodotironina etc.

De asemenea, sînt prezentate anumite glande din punctul de vedere al rolului lor în rezistența organismului la diferite agresiuni. Dintre acestea, corticosuprarenala este deosebit de atent examinată ca o importantă piesă de rezistență a organismului.

Fenomenele transportului membranar (Na^+, K^+, Ca^{++}) în stările de intoxicație sînt, de asemenea, descrise *in vivo* și *in vitro*. Sînt prezentate și unele situații particulare, ca șocul consecutiv arderilor. În fine, un parametru intens cercetat, echilibrul acido-bazic, este, după cum era și firesc, multiplu corelat cu feluritele stări de șoc.

Beneficiind de o excelentă prezentare grafică, conținînd un foarte bun index, lucrarea este deosebit de utilă, interesînd în mod special medicii și biologii și în general pe cei care se ocupă cu fiziologia omului.

Mihai Zamfir

Antibiotics, vol. IV: *Biosynthesis (Biosinteză)*, sub red. JOHN W. CORCORAN, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1981, 164 figuri, 380 pagini

Volumul de față continuă „Series on Antibiotics" editată de Springer-Verlag începînd cu 1960. Reprezentînd, de fapt, o continuare a volumului II, editat înainte de 1970, cuprinde un grup de contribuții vizînd acele antibiotice a căror biosinteză a fost aprofundată și înțeleasă după apariția volumului II. În esență, fără a fi o enciclopedie, prezintă numeroase substanțe studiate din punctul de vedere al biosintezei lor. Sînt descrise astfel antibioticele majore, excluzînd antibiotice și compuși naturali corelați, a căror biosinteză este fie similară, fie nu îndeajuns studiată în detaliu. În general, autorii participanți au organizat materialul în modul solicitat de editor, cuprinzînd teme centrale sau căi de biosinteză.

Cartea cuprinde 14 capitole privind biosinteza următoarelor antibiotice: tetraciclină și antraciclină, ansamicine, antibioticele polieteraminociclitol, B-lactom, metilenomicin A, eritromicine, 16-macrolide și macrolide mai puțin obișnuite, izocromanechinone, antibiotice aromatice, cele pirol (1,4) benzodiazepin, mitomicine, cele conținînd legătura N-N (streptozocin), antibiotice peptidice (tirocidine, gramicidin S și liniare, edeină, alameticin, bacitracine, polimixine, valinomicin, leupeptin, pepstatin și bleomicin, misin și subtilin) și, în sfîrșit, nucleozid-antibiotice (analogi de nucleozide, care utilizează fie adenină ori guanină, fie uracil, citozină sau timină).

Cartea cuprinde capitole generale prezentînd tehnici genetice cromatografice și spectrometrice în studiul biosintezei antibioticelor; în schimb, evidențiază, cu puține excepții, slaba dezvoltare a tehnicilor biochimice clasice, utilizate pentru studierea etapelor enzimatice de biosinteză a unui antibiotic.

Volumul este de un real ajutor cercetătorilor interesați în biosinteza antibioticelor, precum și studenților pentru înțelegerea implicației structurii organice în aceste utilizate molecule care sînt antibioticele.

Victoria Dobre

Hormons, LIPOProteins and atherosclerosis (Hormoni, lipoproteine și ateroscleroză), în *Advances in physiological scienecs* vol. 35, sub red. M. PALKOVIĆ, Pergamon Press — Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1981, 544 pagini

Volumul de față al seriei „Advances in physiological Sciences" cuprinde lucrările prezentate atît la Congresul internațional 28 al științelor fiziologice, care a avut loc la Budapesta în 1980, cît și la Simpozionul satelit congresului, ținut la Bratislava, cu tema „Hormoni, lipoproteine și ateroscleroză". Lucrările prezentate la simpozion au relevat ceea ce este recent investigat în această boală multifactorială, ateroscleroza, și anume rolul decisiv al hormonilor în controlul metabolismului lipoproteinelor și, prin acestea, în dezvoltarea aterosclerozei. Au fost, de asemenea, incluse probleme privind compoziția, sinteza și degradarea lipoproteinelor, precum și aspecte genetice și clinice.

Lucrările, în număr de 42, sînt organizate în cinci capitole: metabolismul lipoproteinelor; hormoni și lipoproteine; ateroscleroză și lipoproteine; aspecte clinice ale hiperlipoproteinemiilor; metode. Problemele investigate sînt diverse, necesitînd studiere în cadrul volumului; capitolul de metode, cel mai scurt, cuprinde două lucrări, și anume izolarea lipoproteinelor de înaltă densitate plasmatice umane prin cromatografie pe coloană și separarea subfracțiunilor triglicerolilor serici prin cromatografie în strat subțire. Un index general de subiecte completează volumul.

Lucrările incluse în volum cuprind nu numai noile date ale cercetărilor, dar și idei și noi tendințe în studiul și terapia deranjamentelor metabolice ale lipoproteinelor și a condițiilor patologice rezultate. Ca atare, induce un interes crescut în cercetarea promițătoare a relației mutuale dintre hormoni, lipoproteine și ateroscleroză.

Victoria Dobre

Mechanism of Muscle Adaptation to functional Requirements (*Mecanismul de adaptare a mușchiului la necesitățile funcționale*), vol. 24, în *Advances in physiological Sciences*, sub red. F. GUBA, G. MARÉCHAL, Ö. TAKÁCS, Pergamon Press—Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1980, 403 pagini

Volumul cumulează lucrările unuia dintre simpozioanele integrate celui de-al 28-lea Congres internațional de științe fiziologice, ținut la Budapesta în 1980.

După cum arată în „Concluzii" editorii maghiari ai volumului, la simpozion s-au discutat aspecte biologice ale celulei musculare, în relație atît cu factori externi, cît și cu modificările funcționale și de structură rapide ale metabolismului celulei.

Sînt abordate, din punct de vedere biochimic și fiziologic, aspecte ca hipokinezie, hipertrofie, inactivitate musculară, dezvoltare, aero- și anaerobioză, imobilizare etc.

Partea a doua se referă, prin nouă comunicări, la un domeniu de mare interes, care s-a impus mai ales în ultimii ani — proteoliza musculară. Se studiază, printre altele, factori de diferite naturi care influențează procesele de degradare din mușchi.

Următoarele secțiuni, care grupează un număr mai mic de comunicări. se referă la sinteza proteică din mușchi, la dezvoltarea musculară și hipertrofie, la regenerarea musculară.

Este de remarcat ultimul capitol, care privește mușchiul ca hrană și în care se abordează, printre altele, metode cantitative de determinare a proteinei musculare, caracterizarea histochimică a cărnii, enzime proteolitice implicate.

Concluziile editorilor și un index pe subiecte încheie volumul, care este util și necesar chiar pentru specialiștii din alte domenii ale chimiei și fiziologiei, deoarece ilustrează direcțiile actuale de cercetare ale mecanismelor musculare.

Vl. Gheordunescu

N-Nitroso Compounds; *Analysis, Formation and Occurence* (*Derivați N-nitroso*; *analize, formare și stare naturală*), Proceedings of the VIth International Symposium on N-Nitroso Compounds, held in Budapest, 16—20 October 1979, sub red. E. A. WALKER, M. CASTEGNARO, L. GRICIUTE și M. BÖRZSÖNY, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1980, IARC Scientific Publications No. 31

Această lucrare, editată cu ocazia celui de-al VI-lea Simpozion internațional în problema cancerului, reflectă creșterea în ultima vreme a interesului pentru derivații N-nitroso. Importanța acestor compuși în cercetarea cancerului este reflectată nu numai prin numărul mare de participanți la acest simpozion, dar și prin diversitatea lucrărilor prezentate.

Derivații N-nitroso sînt descriși din punct de vedere chimic, biochimic și biologic. De asemenea, este prezentat rolul posibil al acestor compuși în etiologia cancerului uman.

Volumul cuprinde patru mari capitole:

1. *Structură chimică și proprietăți chimice*, în care compușii sînt prezentați din punct de vedere chimic, mecanisme de nitrozare *in vitro*, pentru ca apoi să se poată aprecia comportarea acestora *in vitro*, precum și apariția compușilor nitroso în alimente și în mediul industrial.

2. *Analize*, în care sînt comunicate metode de precizie, facilitînd folosirea metodelor spectrofotometrice, de joasă rezoluție.

3. *Date experimentale din mediul înconjurător*, în care sînt relatate date în legătură cu prezența nitroso-aminelor în alimente. Astfel, berea este unul din cele mai importante surse de nitroso-amine. De asemenea, în interiorul noilor automobile s-a constatat prezența nitroso-aminelor volatile.

4. *Patologie experimentală*, în care s-au prezentat capacitatea carcinogenetică a unor nitroso-amine, nitroso-amine specifice din tutun, efectul unor factori secundari, absorbția prin piele, precum și cele mai potrivite sisteme de analize biologice.

Cartea se încheie cu o serie de recomandări pentru cercetările viitoare în acest domeniu.

Eugenia Pandele

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200 — București 2, P. O. B. 2—2.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

S. OERIU, I. OERIU, **Grupările tiolice și rolul lor în biologie**, 1977, 332 p., 31 lei.

ELENA GABRIELESCU, **Neuroproteazele**, 1978, 157 p., 22 lei.

C. TAȘCĂ, **Histopatologia tiroidei**, 1978, 159 p., 20 lei.

IOANA MILCU, LYDIA NANU, **Glanda pineală ca organ metabolic**, 1979, 190 p., 9,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VALERIA GORDUZA, **Polimeri biocompatibili și biologic activi**, 1980, 480 p., 36 lei.

1982 FEB 16

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 24, NR. 2, P. 125—222, BUCUREȘTI, IULIE — DECEMBRIE 1981

c 1515. „I.P.Informația"

43 816

Lei 20